

Université de Sherbrooke

**Les bulles simples brins : talon d'Achille de l'ADN**  
**Zones radio- et photo-sensibilisées par le bromouracile**

par

Sylvain Cecchini

Département de radiobiologie et médecine nucléaire

Thèse présentée à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae doctor (Ph.D.) en radiobiologie et médecine nucléaire

2005

*No experiment is so dumb that it should not be tried.*

*Aucune experimentation n'est assez stupide pour ne pas être essayée.*

*Walter Gerlach  
(Prix Nobel de physique 1943)*

*One of the advantages of being disorderly is that one is constantly making exciting discoveries.*

Un des avantages d'être désordonné, c'est que l'on est constamment en train de faire d'excitantes découvertes.

*A.A. Milne  
(Créateur de Winnie the Pooh)*

*À Julie, Anouk et Alixe*

*À mon père, Bernardino, ma mère, Aurosia,  
et mes deux sœurs, Marie-France et Valérie*

---

## Table des matières

Liste des tableaux, schémas et réactions.....	iv
Liste des abréviations.....	Vii
Résumé.....	ix
Chapitre I – Introduction.....	1
I.1 Découverte de la radioactivité et naissance de la radiothérapie et radiologie.....	1
I.2 Application de la radiation en médecine.....	1
I.2.1 Radiologie diagnostique.....	2
I.2.2 La médecine nucléaire.....	2
I.2.3 La radiothérapie.....	3
I.2.4 Radiobiologie.....	4
I.2.5 Cancers traités par les radiations ionisantes.....	4
I.3 Effet des radiations gamma et UV sur l'ADN.....	5
1.3.1 Rayonnement ionisant et transfert d'énergie linéaire.....	5
1.3.2 Effet direct et indirect.....	6
1.3.3 Radiolyse de l'eau.....	7
1.3.4 Effet des radicaux libres sur l'ADN.....	9
1.3.5 Effet des électrons secondaires.....	12
1.3.6 Effet des UV sur l'ADN.....	13
I.4 Caractéristique du 5-bromouracile.....	16
I.4.1 physico-chimique/moléculaire.....	17
I.4.2 Etudes au niveau cellulaire/Animal.....	21

---

I.4.3	Essais cliniques.....	24
I.4.4	BrU et électrons Auger.....	26
I.4.5	BrU et UV.....	28
I.4.6	Autres utilisations des pyrimidines halogénées.....	29
I.5	Projet de recherche.....	30
Chapitre II – Premier article.....		31
Single strand specific radiosensitization of DNA by Bromodeoxyuridine.		
Chapitre III – Deuxième article.....		44
Interstrand cross-links: A new type of gamma ray damage in bromodeoxyuridine substituted DNA.		
Chapitre IV – Troisième article.....		54 a)
Interstrand cross-link induction by UV radiation in bromodeoxyuridine substituted DNA : dependence on DNA conformation.		54 b)
Chapitre V – Discussion.....		85
V.1	Comment a-t-on choisi les conditions d'irradiation?.....	85
V.2	Quels sont les résultats originaux obtenus avec un oligonucléotide dont une thymine a été substituée par un BrdUrd?.....	87
V.3	Comment les électrons aqueux interagissent avec le BrdUrd?.....	90
V.4	Quels sont les mécanismes impliqués dans la sensibilisation d'un	

---

ADN par la lumière UV et en présence de BrdUrd?.....	92
V.5 Quelle est cette nouvelle structure de l'ADN en « fermeture éclair »?	96
V.6 Quels sont les événements amenant à la cassure de brin par le BrdUrd?.....	97
V.7 Comment les électrons secondaires pourraient interagir avec le BrdUrd incorporé dans un ADN.....	98
V.8 Distribution du dépôt d'énergie d'un rayonnement gamma pouvant amener aux dommages à l'ADN bromé?.....	99
V.9 Existe-t-il des zones simple brin dans la cellule?.....	100
V.10 Quelle est l'influence du milieu?.....	102
V.11 Est-ce l'effet direct ou indirect qui est prépondérant dans le dommage au BrdUrd dans les cellules?.....	105
V.12 Peut-on expliquer l'échec de la radiosensibilisation des tumeurs par le BrdUrd en clinique?.....	106
Chapitre VI – Conclusions.....	110
Références.....	112
Remerciements.....	125

---

## Listes des figures, réactions et tableaux

Figure I.1	Effet direct et indirect des irradiations sur l'ADN.....	7
Réaction I.1	Radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau.....	8
Tableau I.1	Valeur $G_R$ des radicaux primaires issus de la radiolyse de l'eau par des rayonnements de différents TEL.....	8
Réaction I.2	Captation des radicaux hydroxyles par le <i>ter</i> -butanol...	8
Réaction I.3	Captation des électrons aqueux par le radical hydroxyle.	8
Réaction I.4	Captation des électrons aqueux par l'oxygène dissous...	9
Tableau I.2	Valeur $G$ des radicaux issus de la radiolyse de l'eau $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ -irradiation.....	9
Tableau I.3	Effet des rayonnements gamma sur l'ADN cellulaires...	10
Figure I.2	Cytotoxicité (◦) et mutabilité (●) relative de cellules de mammifères en fonction de la longueur d'onde.....	14
Tableau I.4	Distribution de photoproduits de thymine intra- et interbrin avec UVC sur un ADN sec .....	16
Figure I.3	structure chimique des photoproduits impliquant deux thymines adjacentes.....	16
Tableau I.5	Rendement de dégradation du bromouracile et de la thymine sou différentes conditions.....	17
Figure I.4	Attachement initial des électrons aqueux et du radical hydroxyle sur le 5-bromouracile et la thymine.....	19
Tableau I.6	Efficacité de migration de l'électron vers le BrU.....	20
Figure I.5	Formes tautomères du BrdUrd et appariements possibles.....	21

---

Tableau I.7	Aberrations chromosomiques par cellule en présence ou non de BrdUrd.....	22
Figure I.6	Mécanisme de dégradation du BrdUrd par UV.....	28
Figure I.7	Réarengement biradicalaire entre le radical urydynyle et le radical cation de l'adénine.....	29
Figure III.1	Action des électrons aqueux sur un ADN bromé semi-complémentaire.....	44
Figure IV.1	Action des rayonnement UV sur un ADN bromé complémentaire et semi-complémentaire.....	54
Figure V.1	Rendement radiolytique ( $G_R$ ) de dégradation du BrdUrd ou de formation de BrU ou dUrd.....	85
Figure V.2	Cassure de brin en fonction du Fer dissous en présence d'EDTA 25mM.....	86
Figure V.3	Cassure simple brin en fonction de la concentration d'EDTA.....	88
Figure V.4	Cassure de brin autour du BrdUrd en fonction du nombre bases mésappariées.....	89
Tableau V.1	Influence de la structure de l'ADN sur les cassures du brin bromé en fonction du rayonnement.....	90
Tableau V.2	Électronégativité et affinité électronique des différents atomes constituant les bases pyrimidines.....	91
Figure V.5	Délocalisation de l'électron et probabilité de présence sur les atomes sur le BrdUrd en simple brin (A) ou en double brin, hybridé avec une adénine (B).....	92
Figure V.6	Photosensibilisation et polarisation du BrdUrd.....	93
Figure V.7	Schéma de photolyse d'un produit bromé ( $X = Br$ ) .....	94



---

Figure V.8	Radical uracyle : élément central dans la photo et radio-sensibilisation.....	98
Figure V.9	Ouverture de l'ADN au cours de la transcription d'un gène par la T7 polymérase.....	101
Figure V.10	Interaction d'un électron aqueux avec une liaison peptidique.....	102
Tableau V.3	Exemple de constante de vitesse de réaction avec un électron aqueux et des glycines modifiées.....	103
Figure V.11	Interaction d'un électron aqueux avec un groupement thiolé.....	103
Tableau V.4	Pression d'oxygène et pH en fonction de la distance aux vaisseaux sanguins.....	107
Figure V.12	EOR en fonction de la profondeur des cellules dans la tumeur.....	108

---

## Abréviations

[BrU] <sup>-</sup>	Anion 5- bromouracile
A	Adenine
AB	Bromodeoxyuridine substituted oligonucleotide #1
AD	Attachement dissociatif
ADN-A	ADN forme A
ADN-B	ADN forme B
AT	Non-bromodeoxyuridine substituted oligonucleotide #2
B	Bromouracile
Br <sup>•</sup>	Atome de brome radicalaire
Br <sup>-</sup>	Atome de brome anionique
BrdUrd	5-bromodeoxyuridine
BrdUrdTP	5-bromodeoxyuridine triphosphate
BrU	Bromouracile
C	Cytosine
C-Br	Lien chimique entre l'atome de brome et un atome de carbone
CC	semi-complementary oligonucleotide #4
DBc	ADN double brin complémentaire
DBsc	ADN double brin semi-complémentaire
DS <sub>c</sub>	ADN double brin complémentaire
DS <sub>sc</sub>	ADN double brin semi-complémentaire
TMP	Thymidine monophosphate
dUMP	Déoxyuridine monophosphate
dUrd	Déoxyuridine
dUrd <sup>-</sup>	anion déoxyuridinyle
dUrd <sup>•</sup>	radical déoxyuridinyle
e <sub>aq</sub>	Électron aqueux
EDTA	Acide éthylène diaminetétraacétique
FdUrd	5-Fluorodeoxyuridine
G	Guanine

---

Gr()	Rendement radiolytique (mol.J <sup>-1</sup> )
Gy	Gray (J.Kg <sup>-1</sup> )
HO <sup>•</sup>	Radical hydroxyle
ICL	Dimère interbrin
IdUrd	5-Iododeoxyuridine
MeV	10 <sup>6</sup> electron volt
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical Superoxide
<i>t</i> -BuOH	<i>Tert</i> -butanol
TEL	Transfert d'énergie linéaire
UVA	Lumière ultraviolette zone A
UVB	Lumière ultraviolette zone B
UVC	Lumière ultraviolette zone C
H <sup>•</sup>	Radical hydrogène
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène

---

## Résumé

Depuis les années 60, le bromodeoxyuridine (BrdUrd) a été reconnu comme étant un bon radiosensibilisateur des cellules en prolifération. L'incorporation de BrdUrd dans l'ADN génomique de ces cellules augmente ostensiblement la production de cassures simples et doubles brins ainsi que les aberrations chromosomiques. Reconnus comme étant de bons radiosensibilisateurs, ces analogues halogénés de la thymidine tels que le BrdUrd, IdUrd ou le fluorodeoxyuridine ont rapidement trouvé un engouement au niveau clinique : radiosensibiliser les cellules tumorales. Malgré de nombreux essais cliniques, deux récentes études en phase III, n'ont démontré aucune augmentation de la régression tumorale chez les patients traités avec du BrdUrd avant la radiothérapie. Ces dernières études, terminées en 2004, ont mis fin aux espoirs d'utiliser le BrdUrd comme radiosensibilisateur de tumeurs.

Toutefois, les mécanismes fondamentaux impliqués dans les cassures de brins au niveau de l'incorporation du 5-BrU n'ont toujours pas été complètement élucidés. Entre les études réalisées sur les bases halogénées en solution, en phase solide ou gazeuse, et celles réalisées dans les cellules, certaines connaissances restent incertaines. Quels sont les différents événements qui induisent les cassures de brins après la fragmentation du BrdUrd par les électrons aqueux ou secondaires? Existe-t-il des structures d'ADN plus radiosensibles que d'autres? Quels sont les différents dommages induits par la présence de BrdUrd lors de l'irradiation gamma d'un ADN bromé? En radiolyse ou en photolyse, les mécanismes de sensibilisation de l'ADN par le BrdUrd sont-ils les mêmes?

---

Au cours de notre recherche, nous avons tenté de répondre à ces différentes questions. Nous avons pu affirmer, contrairement aux hypothèses émises dans la littérature, que le BrdUrd n'augmente pas ou peu les cassures radio-induites dans un ADN doubles brins parfaitement hybridés. Cette base halogénée est un bon radiosensibilisateur lorsqu'elle est incorporée dans un ADN simple brin ou lorsqu'elle se retrouve dans une zone simple brin d'un ADN double brin. Nous avons également pu révéler un nouveau type de dommages radio-induits : les dimères interbrins. Nos résultats, nous ont pareillement indiqué que les mécanismes de cassures de brin par le BrdUrd en radiolyse et en photolyse sont identiques et initiés par la présence d'un électron supplémentaire sur cette base. Cependant, avec les rayonnements UV, cet électron est accompagné d'un dépôt d'énergie ce qui modifie extrêmement le comportement du BrdUrd.

Nos résultats peuvent ainsi avoir d'importantes implications pour l'usage en clinique du BrdUrd comme radiosensibilisateur ainsi que le développement de nouveaux produits ciblant certaines zones plus sensibles de l'ADN : par exemple les bulles de transcription, les fourches de réplication et les télomères.

## **I Introduction**

### **I.1 Découverte de la radioactivité et naissance de la radiothérapie et radiologie**

La naissance de la radiobiologie et la radiothérapie s'est produite après deux grandes découvertes. La première découverte est celle « d'un nouveau type de rayons », les rayons X, par Röntgen (1895). La deuxième découverte est celle de la radioactivité naturelle par Antoine-Henri Becquerel (1896) et par Marie et Pierre Curie (1898). Ces travaux, récompensés par des prix Nobel, ont rapidement trouvé des applications médicales, autant au niveau du diagnostic que de la thérapie. De nombreuses expériences menées par certains pionniers, tels que Antoine Bécère ou Claudius démontrèrent qu'il était possible d'utiliser ces radiations dites ionisantes dans le traitement du cancer. Plusieurs autres découvertes, telles que la découverte des particules alpha et bêta (par Ernest Rutherford, prix Nobel de chimie en 1908, et Frederick Soddy) ou la découverte de la production d'isotopes artificiels (Irène Curie et son mari, Frédéric Joliot) ont permis de nouvelles avancées dans les domaines de la radiothérapie et de la médecine nucléaire. Tous ces développements ont rendu possible la production de nouveaux radio-isotopes comme le phosphore-32, l'azote-13, le fer-59, le cobalt-60, l'iode-131, le technétium-99, le césium-137.

### **I.2 Application de la radiation en médecine**

Trois domaines de la médecine ont ainsi pu profiter de ces découvertes et des technologies qui en découlent : la radiologie, la médecine nucléaire et la radiothérapie.

On considère de nos jours que l'irradiation d'origine médicale est la deuxième plus importante source d'exposition aux rayonnements ionisants que les individus subissent au cours de leur vie (1,2mSv, soit 32% de la dose totale reçue par personne et par année). La première source d'exposition est d'origine naturelle (radon 222, potassium 40, rayonnements cosmiques).

### **I.2.1 Radiologie diagnostique**

La principale application de rayonnement ionisant est l'utilisation de rayons X en radiologie, rayonnements électromagnétiques d'énergie suffisante pour qu'une partie du rayonnement puisse traverser les objets sans être altérée. Le principe de l'image radiographique résulte de la différence d'atténuation des rayons X dans les milieux traversés. Cette technique permet de détecter ainsi des modifications dans la structure ou la fonction de tissus endommagés par une maladie ou une blessure. Il existe plusieurs types d'appareils de diagnostic utilisant les rayons X en association avec des produits de contraste ou non, tels que la tomographie conventionnelle, la fluoroscopie, l'angiographie et plus récemment le « CT-scan » (computer tomography).

### **I.2.2 La médecine nucléaire**

Un autre domaine de la médecine basé sur l'utilisation de produits radioactifs et de rayonnements ionisants est la médecine nucléaire. Cette discipline pris naissance en Amérique du Nord, il y a un peu plus de 60 ans. Le "Berkeley Lab" de Californie est reconnu comme étant le berceau de ce domaine. Ernest Lawrence, l'inventeur du

cyclotron, a reconnu rapidement les grandes possibilités des isotopes radioactifs pour la médecine et a été un pionnier de l'imagerie médicale moderne. La médecine nucléaire est devenue une branche de la médecine et désormais spécialité médicale consacrée à l'utilisation d'éléments radioactifs pour l'examen ou le traitement de patients, en particulier les patients atteints de cancer. Ces radioéléments sont utilisés pour des explorations de prolifération cellulaire, de pharmacocinétique ou pour des scintigraphies (18F-fluorodeoxyglucose). Ces isotopes radioactifs sont également utilisés en curiethérapie métabolique, ce qui consiste à l'injection de substances radioactives en solution liquide par voie veineuse. L'iode 131 pour les cancers de la thyroïde et le phosphore 32 pour la polyglobulie primitive sont les plus courantes. Une autre voie de recherche et d'application médicale est l'immunocuriethérapie qui consiste à accrocher une substance radioactive (iode 131 par exemple) à un anticorps monoclonal ciblant les cellules cancéreuses.

### **I.2.3 La radiothérapie**

Depuis le début du  $xx^{ième}$  siècle, les rayonnements ionisants se sont ajoutés à la chirurgie comme traitement anticancéreux. Les techniques se sont considérablement diversifiées et améliorées, grâce à la découverte de la radioactivité artificielle, des rayonnements de haute énergie (électrons, photons) et des particules lourdes (protons, faisceaux d'ions). Avec la chirurgie, la radiothérapie est le traitement le plus répandu pour soigner les cancers. Cette thérapie participe au traitement curatif primaire chez 30% des patients cancéreux et 50% de tous les malades cancéreux recevront une irradiation au cours de l'évolution de leur maladie. Le traitement le plus courant est



une irradiation par voie externe et fractionnée (Cobalt 60 ou rayon X). Mais de plus de plus afin de limiter l'irradiation des tissus ciblés, des implants de sources radioactives scellées sont directement placés au contact ou au sein de la tumeur. Cette technique appelée curiethérapie (endocuriethérapie ou plésiocuriethérapie) permet ainsi une irradiation mieux contrôlée et plus localisée. Il est ainsi possible d'implanter des sources directement à l'intérieur des tissus cancéreux (peau, lèvre, sein, langue, prostate) : c'est l'endocuriethérapie ou curiethérapie interstitielle. Dans d'autres cas, s'il est impossible de cibler un tissu, on peut placer les sources dans les cavités naturelles (vagin, utérus, nasopharynx) : c'est la plésiocuriethérapie ou curiethérapie endocavitaire.

#### **I.2.4 Radiobiologie**

La radiobiologie est née avec la découverte des rayons X par Röntgen. Cette science a pour objectif d'élucider les effets des rayonnements dits ionisants (rayons X, gamma) et/ou excitants (lumière UV) sur la matière vivante pour ainsi développer et améliorer les diverses applications médicales.

#### **I.2.5 Cancers traités par les radiations ionisantes**

La radiothérapie peut être employée pour traiter presque chaque type de tumeur solide, y compris des cancers du cerveau, du sein, de l'utérus, du larynx, du poumon, du pancréas, de la prostate, de la peau, de l'estomac, de l'utérus, ou des sarcomes de tissus mous. Le rayonnement peut également être employé pour traiter la leucémie et certains lymphomes. La dose et la technique d'irradiation dépendent d'un certain

nombre de facteurs tel que le type de cancer et sa proximité à des organes vitaux pouvant être endommagés par rayonnement.

Pour certains types de cancers, le rayonnement peut être dirigé vers les tissus qui n'ont pas l'évidence du cancer (cancer du cerveau). Ceci est fait pour empêcher les cellules cancéreuses de s'accroître dans le tissu qui a reçu le rayonnement. Cette technique se nomme la radiothérapie prophylactique. La radiothérapie peut également être utilisée afin de réduire certains symptômes tels que la douleur ou les compressions médullaires, due à des métastases osseuses. Ceci correspond à la radiothérapie palliative.

### **I.3 Effets des radiations gamma et UV sur l'ADN**

#### **1.3.1 Rayonnements ionisants et le transfert d'énergie linéaire**

Il existe deux types de rayonnements ionisants : électromagnétiques (rayon X et gamma) et particuliers (faisceau d'électrons, protons ou ions). L'action, commune de tous ces rayonnements est la création d'ions et de radicaux très réactifs au sein de la matière. La principale différence entre tous ces faisceaux dits ionisants est la concentration et la distribution des ions formés le long de la trace du rayonnement primaire. On définit par rayonnement primaire, la trace de la particule incidente : pour les rayonnements particuliers ce sont les particules émises tandis que pour les rayonnements électromagnétiques, la particule correspond aux électrons primaires très énergétiques (électrons rapides) issus de la première interaction du photon avec la matière. Pour chacune de ces particules à des énergies données, on mesure alors un

transfert d'énergie linéaire, le TEL, défini par la quantité d'énergie transférée par unité de longueur de la trace.

$$\text{TEL} = dE/dl$$

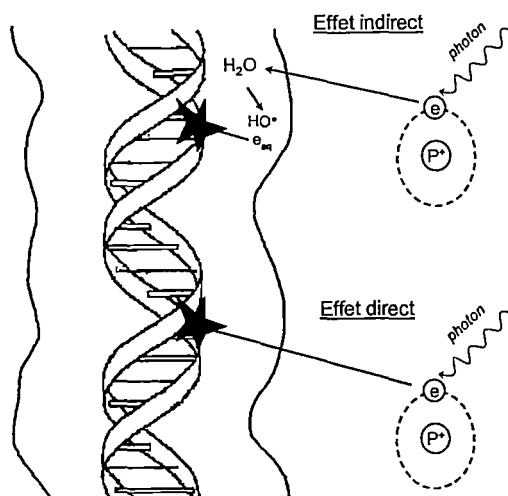
(TEL = énergie moyenne déposée  $dE$  par unité de longueur  $dl$ )

Dans le cas de rayonnements gamma, on parle de TEL faible (de l'ordre de  $0,2 \text{ KeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ) où la concentration des ions formés est très dispersée, comparativement à un faisceau à TEL élevé par exemple les particules alpha ( $166 \text{ KeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ), où la densité d'ionisation est très élevée le long de la trajectoire.

### 1.3.2 Effets directs et indirects (figure I.1)

Les lésions, responsables de la mort cellulaire (saines ou malignes) après irradiation sont essentiellement générées dans l'ADN. Il existe deux effets principaux d'interaction des rayonnements ionisants avec la matière et en ce qui nous concerne avec l'ADN, les effets **directs** et **indirects**. L'**effet direct** correspond à l'ionisation directe de l'ADN par la particule du rayonnement incident. Dans le cas des rayons  $\gamma$  et X, il est considéré que les photons mais également l'ensemble des électrons ayant une énergie cinétique (électrons primaires ou secondaires) peuvent produire un effet direct. Ces électrons, dont l'énergie cinétique est non nulle, peuvent également interagir avec le milieu et produire des radicaux libres sans aucune énergie cinétique. À leur tour, ces radicaux libres peuvent diffuser librement dans le milieu et atteindre la molécule cible; c'est l'**effet indirect**. Dans ces deux cas, les dommages générés dans l'ADN peuvent conduire à une cascade d'événements induisant des changements biologiques. Plus le TEL est élevé et plus l'effet direct est prépondérant. On

considère que dans une cellule l'effet indirect pour un rayonnement gamma est de l'ordre de 50 à 70%, tandis que dans une solution diluée l'effet direct est négligeable.

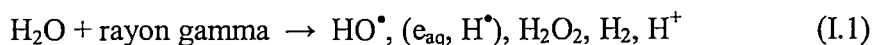


**Figure I.1:** Effet direct et indirect des irradiations ionisantes sur l'ADN

### 1.3.3 Radiolyse de l'eau

Dans les cellules et les organismes vivants composés de 70% d'eau, ainsi que dans un milieu aqueux, l'**effet indirect** est essentiellement dû à la radiolyse de l'eau. Cette radiolyse se fait en trois étapes majeures. D'abord, une étape *pré-diffusionnelle* pendant laquelle l'électron primaire, très énergétique et issu de l'interaction d'un photon et d'une molécule d'eau, ionise ou excite le milieu, le long de sa trajectoire produisant ainsi de nombreux ions et électrons secondaires. Ensuite, une étape *diffusionnelle* pendant laquelle les différentes entités produites précédemment diffusent dans le milieu, et de façon concomitante, réagissent entre elles par des réactions biradicalaires favorisées par les fortes concentrations en radicaux libres produits dans ces zones hétérogènes. Finalement une étape dite *homogène* qui conduit

à une distribution des espèces radicalaires et moléculaires dans le milieu irradié. À ce stade ( $t \approx 10^{-9}$ s) le bilan de la radiolyse de l'eau peut s'écrire ainsi :



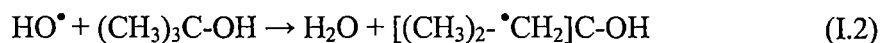
Ce sont ces entités radicalaires et moléculaires qui peuvent réagir avec la molécule cible, soit l'ADN dans notre cas, et produire des réarrangements chimiques engendrant des effets biologiques.

La concentration de chaque espèce varie selon le TEL de la particule. Ainsi, une augmentation des espèces moléculaires et une diminution des espèces radicalaires est observée pour des TEL élevés.

**Tableau I.1 :** Valeur  $G_R$  ( $\times 10^{-7}$  mol.J<sup>-1</sup>) des radicaux primaires issus de la radiolyse de l'eau par des rayonnements de différents TEL (von Sonntag, 1983)

	HO <sup>•</sup>	e <sub>aq</sub> <sup>-</sup>	H <sup>•</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>
<sup>60</sup> Co rayonnement $\gamma$	2,84	2,70	0,61	0,61	0,43	0,026
32 MeV particules $\alpha$	0,97	0,72	0,42	1,00	0,96	0,05
12 MeV particules $\alpha$	0,54	0,42	0,27	1,08	1,11	0,07

Il est également possible de contrôler la concentration de ces radicaux libres dans la phase homogène, en ajoutant dans la solution des atténuateurs de types moléculaires ou gazeux. Les atténuateurs moléculaires tel que le *tert*-butanol sont capables de bloquer spécifiquement l'action des HO<sup>•</sup> en formant un radical très stable majoritairement localisé sur un des groupements methyl (réaction 2), ce qui augmente la concentration en e<sub>aq</sub><sup>-</sup> tout en évitant la réaction 3 de se produire:



En changeant la composition gazeuse de la solution, il est également possible de modifier les concentrations des radicaux libres produits lors de l'irradiation. En remplaçant, dans les échantillons, l'oxygène par de l'azote, il est donc possible d'augmenter le rendement de formation des électrons aqueux en évitant leurs captations par l'oxygène :



Voici quelques exemples de rendement de formation de radicaux libres (G) en solutions dépendamment du gaz dissous et de l'atténuateur présent lors de l'irradiation.

**Tableau I.2 :** Valeur  $G_R$  ( $\times 10^{-7}$  mol.J<sup>-1</sup>) des radicaux issus de la radiolyse de l'eau <sup>60</sup>Co irradiation

Produits	Air	N <sub>2</sub> 2,2 x10 <sup>-3</sup> M	N <sub>2</sub> /tBuOH (1%)	N <sub>2</sub> O 2,2 x10 <sup>-2</sup> M	N <sub>2</sub> O/O <sub>2</sub> (4:1 v:v)	O <sub>2</sub> 2,2 x10 <sup>-3</sup> M
HO <sup>•</sup>	2,7	2,7	0	5,4	5,4	2,7
H <sup>•</sup>	0,55	0,55	0	0,55	-	-
e <sub>aq</sub>	0,026	2,65	2,65	-	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,7	0,7	0,7	0,85	nd	Nd
H <sub>2</sub>	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> /O <sub>2</sub> <sup>• -</sup>	2,65	-	-	-	0,55	3,2

Au cours de nos différentes expériences, nous avons initialement travaillé avec quatre conditions différentes : air, azote, azote plus *ter*-butanol et azote plus EDTA.

### 1.3.4 Effets des radicaux libres sur l'ADN

L'ADN subit plusieurs dommages dits « spontanés » résultants uniquement à l'interaction avec son environnement. Les plus courants sont les processus de

dépuration de l'adénine et la guanine (Lindahl et Nyberg, 1972; Neto et al., 1992), laissant des sites abasiques, et le processus de déamination (Singer et al., 1978) de la cytosine (Lindahl et Nyberg, 1974) laissant à la place un uracile. D'autres facteurs endogènes résultant de la respiration cellulaire (Hudson et al., 1998) ou d'un processus d'inflammation (Chung et al., 2001) peuvent également, par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) amener à l'oxydation des bases et la dégradation du sucre. Ces dommages sont relativement peu fréquents (10000 changements par  $10^9$  nucléotides (Gupta et Lutz, 1999)) et bien réparés dans les cellules saines, mais s'ils demeurent non réparés ou mal réparés ils peuvent conduire à des mutations et à un dérèglement de l'activité cellulaire. L'effet biologique des rayonnements ionisants sur la cellule est similaire à celui produit par le stress « oxydatif » endogène (Douki et al., 2003), mais la concentration très élevée de dommages devient toxique pour la cellule.

**Tableau I.3 :** Effets des rayonnements gamma sur l'ADN cellulaires

Type de dommage par Gy et par cellule	Radiation ionisante (Rayons X, $\gamma$ et électrons rapides)
Trace dans le noyau	~1000
Cassures simple brin	850-1000
Cassures double brin	40
Dommages aux pyrimidines	250
Dommages aux purines	100
Pontages ADN-protéine	150
Evènements létaux	0-5
Aberrations chromosomiques	0-3
Inactivation cellulaire	30%

Les radicaux libres formés directement sur l'ADN ou indirectement par la radiolyse de l'eau conduisent à différents types de dommages radio-induits tels que les bases endommagées, les cassures de brin et les sites abasiques. Il a été démontré que la principale réaction induite par les radiations ionisantes sur l'ADN est due aux radicaux hydroxyles (Pryor, 1988; Cadet et al., 1999). Ces radicaux s'additionnent soit sur les doubles liaisons  $\pi$ , 4, 5 et 7, 8 des bases purines ou 5, 6 des bases pyrimidines, soit arrachent un hydrogène sur le sucre, avec une certaine préférence pour les atomes d'hydrogène sur le carbone en position 4' ou 1' (Breen et Murphy, 1995). Les attaques des radicaux libres  $\text{HO}^\bullet$  sur le sucre engendrent principalement des cassures de brins ou provoquent des sites abasiques tandis que les attaques sur les bases produisent des dommages aux bases. Il a été estimé, *in vitro*, que 80% des réactions des  $\text{HO}^\bullet$  se produisent sur les bases et 20% sur les sucres (Scholes et al., 1969). Toutefois, dans les cellules, ce rapport semble être très différent. Il a été démontré (Pouget et al., 2000) que plus de 50 à 66% des dommages se produisent sur les sucres et seulement 33 à 50% sur les bases. L'accessibilité de l'ADN et le type de radical produit dans les cellules pourraient influencer les sites préférentiels d'attaque radicalaire sur l'ADN. Néanmoins, en estimant que seule l'attaque sur le sucre conduit à des cassures de brins, une surestimation des dommages directs sur le sucre est faite. En effet, certains radicaux formés sur les bases peuvent s'accompagner d'une migration du dommage sur le sucre par abstraction d'un hydrogène, ce qui peut produire des cassures de brin. De plus, Les dommages aux bases sont probablement sous estimés car il nous est encore impossible de détecter toutes les bases endommagées dans l'ADN.



Les électrons aqueux pourtant produits en grande quantité lors d'irradiation gamma ( $0,275\mu\text{M}$  par Gy) semblent très peu intervenir dans les dommages à l'ADN et dans la mortalité cellulaire.

### 1.3.5 Effets des électrons secondaires

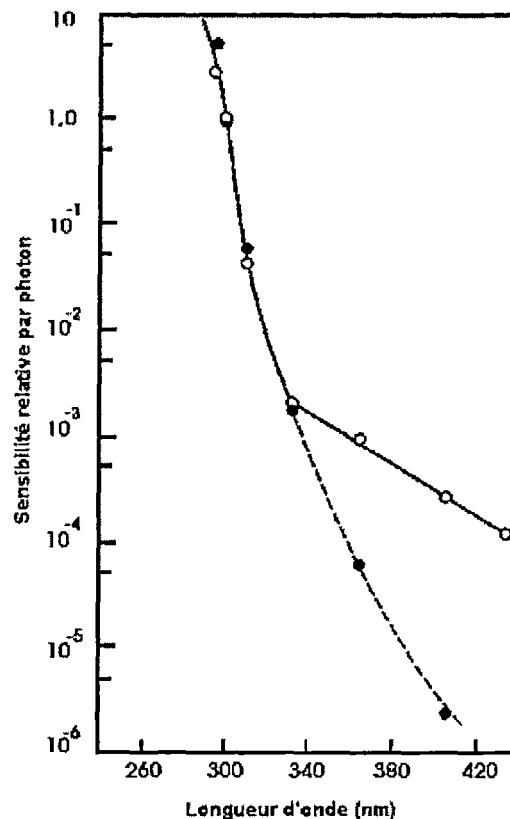
Contrairement aux électrons aqueux, les électrons secondaires, dont l'énergie moyenne est de 20eV, sont capables d'interagir avec l'ADN et d'engendrer de nombreux dommages. Ces électrons sont issus de l'ionisation de la matière le long de la trace d'un électron primaire très énergétique; ils sont produits en très grand nombre (50 000 électrons secondaires par photon de 1MeV) mais ils étaient auparavant peu considérés car ils étaient supposés non dommageables, étant peu énergétique. Depuis, de nombreuses études (Boudaiffa et al., 2000; Sanche, 2002; Abdoul-Carime et Sanche, 2002; Zheng et al., 2004) réalisées essentiellement par l'équipe du Dr Léon Sanche, ont mis en évidence la possibilité de ces électrons de briser l'ADN par un mécanisme dit d'attachement dissociatif. L'électron de faible énergie interagit avec la molécule cible formant un ion transitoire. Si la demi-vie de cet ion est suffisamment longue et permet une déformation de cette molécule, certaines liaisons chimiques peuvent se rompre et amener une dissociation de la molécule, produisant ainsi un ion et une molécule radicalaire. Ce nouveau radical formé, s'il se trouve dans ou proche de l'ADN, peut par réorganisation chimique engendrer des dommages aux bases et aux sucres.

### 1.3.6 Effets des UV sur l'ADN

Depuis longtemps, les effets toxiques et mutagènes des photons UV (ultraviolet) sur les cellules ont été étudiés, montrant une corrélation entre l'exposition aux photons UV issus du soleil et l'augmentation des cancers de la peau (Epstein, 1978; Van der Leun, 1984; Larsson, 2005). Le rayonnement UV correspond à des photons d'énergies comprises entre 12 et 3,1 eV (entre 100 et 400 nm). Toutefois, les UVC (de 100 à 280 nm) qui sont les plus énergétiques sont totalement arrêtés par la couche d'ozone et les UVB (de 280 à 315 nm) partiellement absorbés par l'atmosphère. Aussi, lumière UV qui atteint la surface de la terre est à 99% de type UVA (315 à 380 nm) et 1% de type UVB. Ces photons UV ont une énergie insuffisante pour ioniser directement la matière, mais lorsqu'ils sont absorbés par celle-ci, ils peuvent exciter certaines molécules. Ces molécules excitées peuvent soit relâcher leur excès d'énergie sous forme de chaleur, soit amener des ruptures de liens ou des transferts de charges et ainsi réagir avec leur entourage proche ou à distance afin de provoquer des modifications chimiques. Le spectre d'absorption de l'ADN est compris entre 180 et 320 nm, soit dans la gamme de la lumière UVC et UVB. Longtemps, l'effet mutagène et létal des photons émis par le soleil était, pensait-on, dû à un effet direct d'absorption des photons UVB par l'ADN. Les UVC ne passant pas la stratosphère et les UVA n'étant pas absorbés par l'ADN, ces longueurs d'ondes étaient supposées inoffensives. Toutefois, depuis les années 80 (Kligman et al., 1985; Coohill et al., 1987), il a été prouvé que les UVA pouvaient également avoir des effets mutagènes (Rochette et al., 2003) et létaux sur les cellules (figure I.2). L'effet toxique des UVA, voire même de la lumière visible, est obligatoirement associé à la présence de certains chromophores

dans le milieu. Ces molécules peuvent être des sources endogènes (Gange, 1988) telles que les flavines (Sato et al., 1995; Peak et al., 1995), ou exogènes telles que les stéroïdes ou des quinones (Condorelli, 1999). Ces produits ont la capacité d'absorber des photons à des longueurs d'onde beaucoup plus élevées (UVA) que l'ADN. On appelle certaines de ces molécules des photosensibilisateurs car elles ont la possibilité d'induire certains dommages à la cellule. Il existe deux types de photosensibilisateur (Foote, 1968; Ravanat, 2001) : le type I ou le type II.

**Figure I.2 :** Cytotoxicité (○) et mutabilité (●) relative de cellules de mammifères en fonction de la longueur d'onde (Setlow, 1993)



Le type I se caractérise par un **transfert de charge** entre le photosensibilisateur et l'ADN. Un électron est arraché sur une des bases de l'ADN produisant ainsi radical cation, appelé « trou ». Les quatre bases sont susceptibles d'être touchées mais c'est la guanine (Douki Cadet, 1999) qui a le potentiel d'ionisation le plus bas (1.2v) qui sera la plus réactive. Le photosensibilisateur peut à son tour céder l'électron excédentaire à l'oxygène et former un anion superoxyde, qui peut à son tour se dismuter en  $H_2O_2$ . Cette espèce est très toxique car elle peut, par réaction de Fenton, produire des radicaux  $HO^\bullet$  très réactifs. Les photosensibilisateurs de type II se caractérisent par un **transfert d'énergie** entre le photosensibilisateur excité et un oxygène, amenant ce dernier à passer d'un état fondamental triplet à un état singulet. Cet oxygène à l'état singulet peut attaquer l'ADN et particulièrement la guanine et produire de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (Wamer et Wei, 1997) et du spiroiminodihydantoine (Niles et al., 2001).

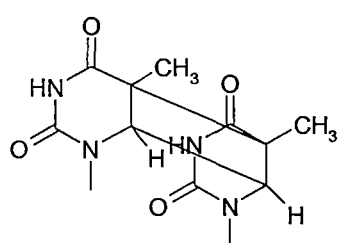
*Ainsi les dommages formés par les UVB et C* sont essentiellement des dimères de pyrimidines intrabrins tels que les photoproduits 6-4 de pyrimidines, les dimères de cyclobutanes et les photodimères de thymidine découverts la première fois dans les spores de bactéries en condition anhydre. Toutefois, l'équipe du professeur Jean Cadet a démontré et caractérisé la formation de dimères de pyrimidines interbrins avec des UVC dans un ADN-A (Douki et al., 2003) (déshydraté ou dans une solution de 80% méthanol).

*Les dommages formés par les UVA* sont toujours associés à un photosensibilisateur de type I ou II. Ils peuvent ioniser certaines bases telles que la guanine (Besaratina et al.,

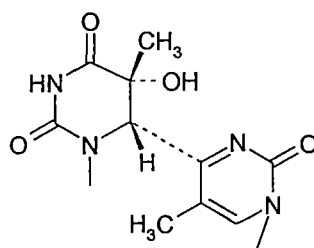
2004) ou l'adénine (Wang et al., 2002) et mener ainsi à des dommages aux bases et possiblement à des dimères intrabrins voire mêmes interbrins (Bergeron et al., 2004).

**Tableau I.4 :** Distribution de photoproduits de thymine intra- et interbrins avec UVC sur un ADN sec (rendement des lésions par  $10^8$  bases et par  $J.m^{-2}$ )

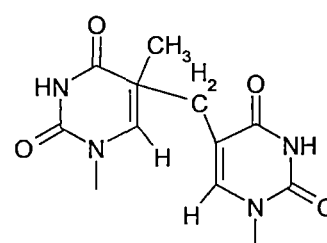
Photoproduits	Cyclobutane	(6-4)	Spore
Intrabrins	10	1,5	3
Interbrins	8	0,2	3,5



Dimère de cyclobutane



(6-4) photoproduit



5,6-dihydro-5(a-thyminyl)-thymine (spore photoproduits)

**Figure I.3 :** structure chimique des photoproduits impliquant deux thymine adjacentes

#### I.4 Caractéristiques du 5-bromouracile

Le bromouracile fait parti de la famille des bases pyrimidines modifiées et halogénées. Connue depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle, ses premières utilisations furent comme précurseur (Johnson et Matsuo, 1919) dans la synthèse chimique de « nucléobases » composant de l'ADN. C'est vers les années 60, quelques années après la découverte de la structure de l'ADN (1954) par James Watson, Francis Crick et Rosalind Franklin, que le bromouracile fut découvert comme étant un bon radiosensibilisateur. L'équipe de R. M. Humphrey a montré qu'une augmentation des

aberrations chromosomiques suite à une irradiation aux rayons X était observable dans les cellules qui avaient incorporé du BrdUrd dans leur ADN génomique (Dewey et al., 1966; Somers et Humphrey, 1963).

#### **I.4.1 Caractéristique physico-chimique et moléculaire du BrdUrd**

Les premières études fondamentales sur le bromouracile (Reuschl, 1966) ont rapidement montré la sensibilité de ce produit, comme les autres bases, aux radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau, tel que  $\text{HO}^\bullet$ . Cependant, contrairement aux autres bases, il est également très sensible au  $e_{\text{aq}}^-$ . Reuschl H. mesure des rendements de dégradation du BrU plus élevés dans une atmosphère d'azote ( $\text{N}_2$ ), où autant de radicaux hydroxyles que d'électrons aqueux sont formés, que sous atmosphère de nitrogène ( $\text{N}_2\text{O}$ ), où deux fois plus de  $\text{HO}^\bullet$  sont produits.

$$G_{\text{RN}_2}(-\text{BrU}) = 7,50$$

$$G_{\text{RN}_2\text{O}}(-\text{BrU}) = 5,50$$

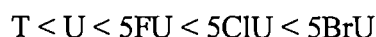
L'équipe de Zimbrick, Ward et Meyers, a également comparé la réactivité (Zimbrick et al., 1969; Zimbrick et al., 1969) en radiolyse pulsée et statique du 5-bromouracile et de la thymine. Ces études révélèrent que dans de nombreux cas les rendements de dégradation du 5-BrU  $G_{\text{R}}(-\text{BrU})$  étaient bien supérieurs à ceux de la thymine  $G_{\text{R}}(-\text{T})$ . Ils déduisent de leurs recherches que les vitesses d'interaction des électrons aqueux ou du radical hydroxyle ne sont pas très différentes entre la thymine ou le BrU et que les réactions initiales demeurent identiques entre les deux produits face aux deux espèces radicalaires.

**Tableau I.5 :** Rendement de dégradation du bromouracile et de la thymine sous différentes conditions ( $G_R \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$ )

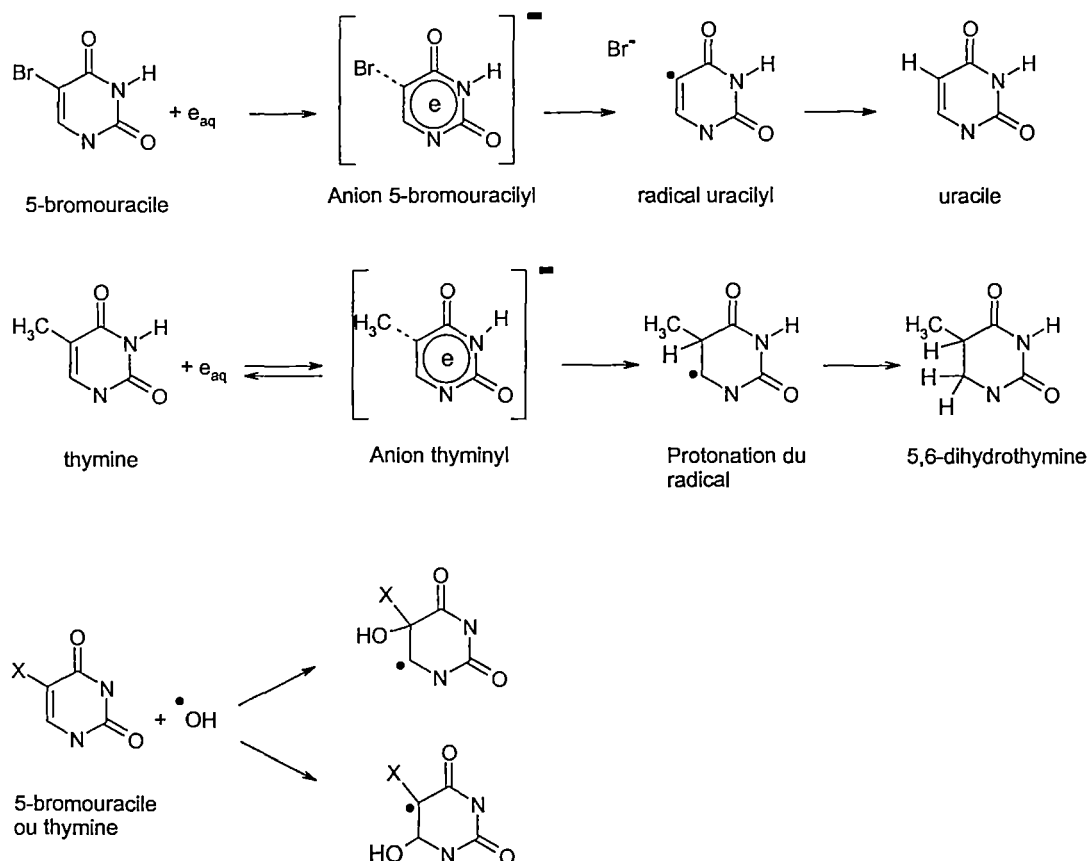
Atténuateur	Gaz dissous	Radicaux	5-bromouracile ( $2 \times 10^{-4} \text{M}$ )		Thymine ( $2 \times 10^{-4} \text{M}$ )
			$G_R (-\text{BrU})$	$G_R (+\text{U})$	$G_R (-\text{T})$
Rien	$\text{N}_2$	$e_{\text{aq}}, \text{HO}^\bullet, \text{H}^\bullet$	4,60	2,2	2,7
0,1M $\text{NaCHO}_2$	$\text{N}_2\text{O}$	$\text{CO}_2^\bullet, \text{HO}^\bullet, \text{H}^\bullet$	40	40	1,34
0,1M $\text{NaCHO}_2$	$\text{N}_2$	$\text{CO}_2^\bullet, e_{\text{aq}}$	40	40	
0,1M t-BuOH	$\text{N}_2$	$e_{\text{aq}}$	3,22	2,61	1,0

Cependant, lors de l'interaction entre l'électron et le BrdUrd, la présence du groupement bromé, très électrophile, peut résulter en un processus irréversible d'attachement dissociatif et former un radical transitoire très réactif, le radical uracilyle. Par contre, dans le cas de la thymine, l'anion formé va réagir avec d'autres produits et éjecter l'électron excédentaire pour ainsi redonner la molécule initiale (figure I.4).

Certaines études théoriques (Wetmore et al., 2001; Li et al., 2002) expliquent la différence de réactivité entre ces deux bases par une plus grande affinité électronique du bromouracile comparativement à la thymine. L'affinité électronique d'une base se définit par la capacité de cette base à capturer un électron. Cette capacité est très dépendante de la substitution réalisée sur la base. Les atomes d'halogène sont des groupements très électrophile qui vont augmenter fortement la capacité des bases substituées à capturer un électron.



Le radical  $\text{HO}^\bullet$ , pour sa part, va être aussi réactif sur les deux bases par addition au niveau de la liaison  $\pi$  en position 5 ou 6 (figure I.4).



**Figure I.4 :** Attachement initial des électrons aqueux et du radical hydroxyle sur le 5-bromouracile et la thymine

Les électrons secondaires, ou de faibles énergies, interagissent, eux aussi, plus spécifiquement avec le BrU qu'avec la thymine. De récentes études sur l'impact des électrons de bases énergies (Sanche, 2002) (0-20eV) en phase gazeuse (Abdoul-Carime et al., 2001), solide (Klyachko et al., 1999; Abdoul-Carime et al., 2000) ont montré que la décomposition de ce produit était initiée par une résonance de quelques femtosecondes de l'électron sur la molécule. Certaines résonances entre les électrons et le BrU sont observées pour des électrons d'énergie proche de 0eV. Un attachement



dissociatif (AD) de cet anion transitoire s'en suit et se traduit par la fragmentation de la base bromée. Deux types de fragmentation ont été observés en phase gazeuse soit le départ de l'anion  $\text{Br}^-$  et la production du radical uracyle ou le départ d'un radical  $\text{Br}^\bullet$  et la production d'un anion uracyle. Cette étude a permis de discuter de la possibilité que bromouracile engendre des dommages non seulement sur le brin d'ADN portant cette base modifiée, mais également sur le brin opposé, par migration du radical  $\text{Br}^\bullet$ .

D'autres études ont montré la possibilité d'un transfert de charge entre les autres bases et le BrU (Adams et Willson, 1972; Nese et al., 1992) en solution ou le long du brin d'ADN (Beach et al., 1994; Ito et Rokita, 2003). Une étude réalisée par l'équipe de Zimbrick démontre que les électrons aqueux captés par l'ADN peuvent migrer le long du brin jusqu'à la base bromée. Dans le cas d'un ADN simple brin, la migration moyenne de l'électron se produit sur 5 à 6 bases de distance, dépendamment de la séquence (Fuciarelli et al., 1994). Par contre, en double brin, cette migration est deux fois moins importante et la spécificité de séquence est différente (Fuciarelli et al., 1994).

**Tableau I.6 :** Efficacité de migration de l'électron vers le BrU

Simple brin	Double brin
A > T >> C, G	G > C, T > A
5 à 6 bases	3 à 4 bases

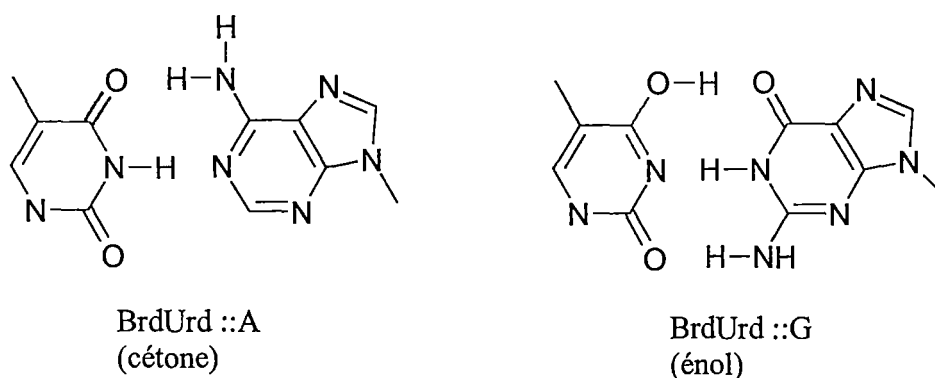
Ces différentes études confirment le fait que l'ADN est radiosensibilisé via l'attachement d'un électron directement sur le BrdUrd ou via la migration de cet

électron le long de l'ADN et la formation d'un intermédiaire radicalaire, le radical uracile. Il y a donc, au sein de l'ADN, formation de ce radical très réactif pouvant arracher un hydrogène sur le sucre proximal et engendrer une cassure simple brin.

### I.4.2 Caractéristique cellulaire/animal

Le 5-bromo-2'-deoxyuridine ne semble pas ou peu reconnu par les cellules comme un nucléoside exogène ou endommagé. La taille de l'atome de brome ( $r(\text{Br}) = 0,195\text{nm}$ ) étant comparable à celle du groupement méthyle ( $r(\text{CH}_3) = 0,20\text{nm}$ ), la phosphorylation du nucléoside se fait facilement grâce à la voie secondaire de synthèse de thymidine triphosphate par la thymidine kinase (Kit et al., 1966). Le BrdUrdTP ainsi formé peut être incorporé lors de la synthèse ou la réparation de l'ADN par différentes polymérases. Il est ainsi possible de substituer, dans l'ADN, jusqu'à 50% des thymidines par le BrdUrd (Szybalski, 1974).

Toutefois, une récente étude théorique (Hu et al., 2004) a montré un possible effet mutagène du BrdUrd, causé par la grande stabilité de ses deux formes tautomères qui peuvent engendrer une conversion de A vers G (figure I.5).



**Figure I.5 :** Formes tautomères du BrdUrd et appariements possibles.

Aussi, à cause de la forme enol du BrdUrd, la DNA polymérase peut faire un mésappariement et placer une guanine en face du BrdUrd. D'autres études ont montré qu'il était possible pour la cellule de reconnaître et d'enlever le BrdUrd dans l'ADN par la voie post répllicative de réparation des mésappariements (MMR) (Berry et Kinsella, 2001). C'est ainsi que l'équipe de Kinsella a démontré qu'il y avait 1,5 à 2 fois plus de IdUrd dans les cellules HTC116 déficientes en réparation MMR (*hMLH1*<sup>-</sup>) comparativement aux mêmes cellules HTC116 dont le gène actif (*hMLH1*) fut réintroduit (Berry et al., 1999). Cependant la toxicité et l'effet mutagène restent négligeables pour des faibles pourcentages de substitution (10 à 15%).

Une des premières expériences réalisées sur l'effet radiosensibilisateur du BrdUrd sur les cellules fut effectuée par l'équipe de Humphrey en 1965. Une forte augmentation des aberrations chromosomiques était observée dans les cellules ayant incorporé le BrdUrd et soumises à une irradiation de 2 Gy.

**Tableau I.7 :** Aberrations chromosomiques par cellule en présence ou non de BrdUrd

Irradiation (Gy)	0	2
Thymidine	2	4
BrdUrd	5	27

Des études cellulaires ont prouvé que l'augmentation des cassures radio-induites simples et doubles brins était dépendante du pourcentage d'incorporation du BrdUrd dans l'ADN génomique, tout en étant indépendante de la substitution soit sur un ou les deux brins (Ling et Ward, 1990). Les chercheurs observent une augmentation de l'ordre de 1,7 pour les cassures simples, et 1,5 pour les cassures

doubles, lorsque 16% des thymines sont remplacées par le BrdUrd. Certaines recherches ont également montré qu'en présence d'un capteur d'électron dans les cellules, il était possible de diminuer de moitié l'augmentation des cassures doubles dans l'ADN, passant ainsi d'un facteur 1,5 à 1,2 pour 16% de substitution. Cela démontre bien la grande contribution des électrons au phénomène de radiosensibilisation de l'ADN par le BrdUrd, déjà observé *in vitro*. La radiosensibilité due à la présence du BrdUrd dans l'ADN peut également être influencée par le type de cellules utilisées et la phase dans laquelle se trouve la cellule lors de l'irradiation.

Il est également possible d'augmenter la radiosensibilité des cellules dites « bromées » en les traitant de façon synergique avec le BrdUrd et un autre agent potentiellement toxique tel que l'hyperthermie (Van Bree et al., 1997) lors de l'irradiation. Le même type d'effet est obtenu en utilisant des drogues telles que le FdUrd ou le methotrexate qui vont bloquer la thymidilate synthase, voie de synthèse *de novo* de dTMP à partir de dUMP dans les cellules. Ces derniers agents obligent ainsi la cellule à utiliser une voie secondaire de phosphorylation du stock de nucléosides libres, tel que le BrdUrd, augmentant ainsi son incorporation dans l'ADN. En jouant avec tous ces facteurs, il est possible d'augmenter ainsi la mortalité cellulaire jusqu'à un facteur de 4 à 5.

De ces différentes expériences, on a émis l'hypothèse que le BrdUrd contribue de deux façons dans la radiosensibilisation des cellules : d'une part, le BrdU augmente le nombre de dommages radio-induits dans l'ADN et d'autre part, il diminue l'efficacité du système de réparation de la cellule par le type de dommages engendrés tels que les cassures doubles ou les dommages locaux multiples.

### I.4.3 Essais cliniques

Les premières études cliniques (Kinsella et al., 1984) utilisant le BrdUrd en radiothérapie ont mis en évidence la possibilité d'augmenter la radiosensibilité des cellules cancéreuses. Malheureusement, l'augmentation de la radiosensibilité des cellules saines était un des facteurs limitant important. Aussi, dès les premiers essais cliniques, deux facteurs principaux étaient considérés comme primordiaux pour une bonne utilisation thérapeutique du BrdUrd : la croissance plus rapide des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines et l'utilisation d'une concentration de BrdUrd en dessous du seuil de toxicité. En ce qui concerne le premier facteur, la croissance des cellules cancéreuses doit être effectivement plus rapide que celle des cellules des tissus sains entourant la tumeur, de façon à permettre une plus grande incorporation du BrdUrd dans l'ADN de ces cellules (Knol et al., 1995) lors de leur division. La radiosensibilité des cellules cancéreuses sera donc proportionnellement augmentée en fonction du pourcentage d'incorporation du BrdUrd dans l'ADN (Lawrence et al., 1990). En ce qui concerne le deuxième facteur, une recommandation faite par le NCI (National Cancer Institute) propose une concentration limite de perfusion du BrdUrd, au delà de laquelle ce produit peut engendrer une toxicité (Phuphanich et al., 1984; Groves et al., 1999; Kinsella et al., 2000) aigue chez les patients, amenant des symptômes tels que les vomissements, la diarrhée, l'exfoliation des cellules de la peau, la myelosuppression ou la dermatite aigue. Cette dose optimale de BrdUrd, très dépendante de la sensibilité de chaque patient, a été estimée entre 800 à 1000 mg.m<sup>-2</sup>.jour<sup>-1</sup>. D'autres facteurs, *in vivo*, peuvent également diminuer la concentration du BrdUrd dans les cellules cancéreuses,

tels que la dégradation dans le foie, l'utilisation de thymidine triphosphate endogène ou la faible diffusion à travers la tumeur (Goffman et al., 1992). Différentes stratégies sont donc employées afin de contrer ces différents facteurs : premièrement, l'injection localisée du traitement, par exemple, injection du BrdUrd dans l'artère carotidienne (Matsutani et al., 1988) pour le traitement des lymphomes cervicaux ou l'implantation de capsule de BrdUrd (Li et al., 2004) directement à la périphérie de la tumeur. Deuxièmement, la co-administration d'agents bloquant la dégradation du BrdUrd, tel que le diazouracil (Cooper et Greer, 1970), agent bloquant la déhalogénéation dans le foie. Il est possible également d'administrer avec le BrdUrd, un agent bloquant le métabolisme des pyrimidines, tel que le FdUrd (McLaughlin et al., 1994) ou PALA (Yang et al., 1996) (N-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid), afin de forcer les cellules à utiliser le BrdUrd. Il est ainsi possible d'augmenter jusqu'à 6 fois le taux d'incorporation du BrdUrd dans l'ADN en utilisant 50µM de PALA et de radiosensibiliser de façon synergique des cellules (cellules BG-1, cellules d'adénocarcinome ovarien) par un facteur 30, en co-injectant les deux drogues (BrdUrd + PALA + irradiation).

De nombreux essais cliniques ont été réalisés sur l'utilisation du BrdUrd ou IdUrd comme radiosensibilisateur pour le traitement de plusieurs cancers, comme le cancer de la tête et du cou (Epstein et al., 1998), les tumeurs au cerveau (Levin et al., 1995), les métastases dans le cerveaux (Phillips et al., 1995), les sarcomes des tissus mous (Robertson et al., 1995), le cancer du foie (Speth et al., 1988; Knol et al., 1995), le cancer du pancréas (Robertson et al., 1997) ou le cancer de l'utérus (Eisbruch et al., 1999). L'incorporation du BrdUrd dépend du type de cancer et de la posologie du

traitement pré-irradiation. Cette incorporation peut-être très efficace et atteindre dans le cas de certains cancers du cerveau, un taux de remplacement de la thymine de 5 à 10%. Hélas, toutes ces études n'ont pas réussi à prouver l'effet radiosensibilisant du BrdUrd sur les cellules cancéreuses, ni de plus grandes régressions tumorales. Pourtant, une étude en phase II, menée sur des cellules tumorales gliales traitées par radiothérapie et couplée à l'utilisation de BrdUrd et d'autres agents chimiothérapeutiques, avait donné des résultats prometteurs. Une augmentation de 133 semaines du temps moyen de progression tumorale des cellules astrocytaires avait été notée comparativement à une autre étude réalisée sur le même type de cancer, mais utilisant l'hydroxyurée au lieu du BrdUrd (Levin et al., 1995). Toutefois, deux essais cliniques en phase III, au cours desquels les patients atteints d'un astrocytome anaplastique recevaient ou non le BrdUrd, de façon aléatoire, n'ont démontré aucune amélioration du traitement en présence ou non du radiosensibilisateur (Prados et al., 1999; Prados et al., 2004).

Suite à ces derniers échecs, la plupart des études sur l'utilisation du BrdUrd se sont achevées.

#### **I.4.4 BrU et électrons Auger**

L'augmentation de la mortalité cellulaire due à une plus grande absorption de l'énergie du photon incident par l'atome d'halogène reste controversée. Certaines études appuient la théorie que les électrons Auger produits lors de l'absorption photoélectrique d'un rayonnement X par la couche K de l'atome d'halogène ne contribueraient pas ou peu à l'augmentation de la mortalité des cellules bromées

(Larson et al., 1989). Pourtant, dans d'autres études (Usami et al., 1991), on note une augmentation importante des cassures doubles brins dans un « plasmide bromé » (Menke et al., 1991). On note également une plus grande mortalité des cellules de levures irradiées avec des photons d'énergie supérieure (13,5keV) à l'énergie d'ionisation (13,4keV) de la couche K de l'atome de brome, comparativement à ces mêmes cellules irradiées avec des photons d'énergie inférieure (13,35keV). Si la cascade Auger se produit, il y a une forte probabilité de former des cassures doubles dans l'ADN par un fort dépôt local d'énergie (Karnas et al., 1999). Ceci a été observé lors d'expériences réalisées sur des émetteurs Auger, tels que  $^{125}\text{IdUrd}$  (Bishayee et al., 2000) ou  $^{125}\text{IdCrdd}$  (Lobachevsky et Martin, 2000) incorporés dans le double brin d'ADN. L'isotope 125 de l'iode va se désintégrer, par captation d'électron par le noyau, est ainsi produire un trou dans la couche K de l'atome d'iode. Ce trou va être comblé par une cascade d'électrons, produisant ainsi l'éjection d'électrons Auger. Pour chaque désintégration, une moyenne de 3 cassures simples brins et 0,8 cassures doubles brins se produisent. Certaines études précliniques ont déjà montré la possibilité d'utiliser cet isotope 125 de l'iode, en l'incorporant dans une base pyrimidine pour ainsi cibler des cellules tumorales se multipliant rapidement sans provoquer d'effet sur la survie des patients (Larson et al., 2004).

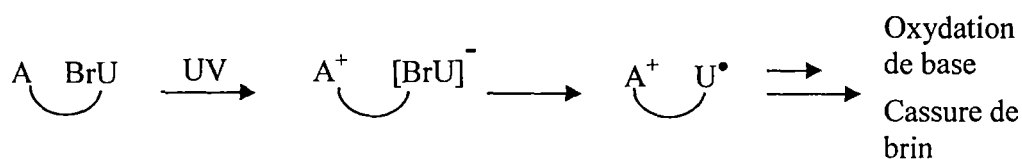
Dans le cas d'un rayonnement gamma, photon, dont l'énergie est très élevée ( $< 1\text{MeV}$ ) va interagir avec le milieu biologique essentiellement par effet Compton et ainsi émission d'électrons de haute énergie. Certaines études ont montrées que en fin de parcours du photon ou de l'électron, l'énergie de serait assez faible pour interagir par effet photoelectrique et déclencher dans certaines cas une cascade Auger. Aussi, dans



le cas d'un ADN bromé, la probabilité d'interaction du photon incident ou de l'électron en fin de parcours avec l'atome de brome dans le but d'engendrer une cascade d'électrons serait très faible mais non négligeable (Pignol et al., 2003).

#### I.4.5 BrU et UV

Les pyrimidines halogénées, telles que le BrdUrd ou IdUrd, sont, *in vitro*, non seulement des bons radiosensibilisateurs, mais également d'excellents photosensibilisateurs (Hagan et al., 1988; Limoli et Ward, 1993). Le principal mécanisme impliqué dans ce phénomène est le fait que BrdUrd agit comme un radiosensibilisateur de type I, amenant l'oxydation d'une base de l'ADN en lui arrachant un électron. La base particulièrement touchée est une adénine vicinale (Cook et Greenberg, 1996). L'excès d'électron situé maintenant sur la base halogénée va favoriser le départ de l'anion  $\text{Br}^-$ . La perte de cet anion laisse dans l'ADN un radical très réactif, le radical uracilyle, capable d'arracher un hydrogène sur un sucre proche et ainsi engendrer une cassure de brin (figure I.6).



**Figure I.6 :** Mécanisme de dégradation du BrdUrd par UV

Ces différentes études prouvent ainsi d'une part, la capacité du BrdUrd à photosensibiliser l'ADN, mais également la migration possible d'une charge ou d'un trou le long de l'ADN. Ces deux phénomènes produisent des dommages multiples à

distance et à partir d'un événement unique (Ito et Rokita, 2003). Il y a alors possibilité de former des dimères interbrins par réarrangement biradicalaire entre deux radicaux rapprochés de l'uridyne et le radical cation de l'adénine (figure I.7).



**Figure I.7 :** réarrangement biradicalaire entre le radical uridyne et le radical cation de l'adénine

Certaines études cellulaires ont montré l'influence du BrdUrd sur la production d'échanges de chromatides sœurs (Wojcik et al., 2003), après irradiations UV. Ce type de réarrangements chromosomiques est souvent la signature de dimères interbrins.

#### I.4.6 Autres utilisations des pyrimidines halogénées

L'une des dernières utilisations en clinique du BrdUrd est actuellement la mesure de la fraction des cellules en prolifération (Hoy et al., 1993) dans une tumeur (Rew et Wilson, 2000) ou dans d'autres types de cellules tels que les lymphocytes (Asquith et al., 2002). Il est ainsi possible de visualiser les nouvelles cellules ayant incorporé le BrdUrd à l'aide d'un anticorps spécifique à celui-ci. Il est également possible de mesurer l'activité transcriptionnelle des cellules, par marquage des ARN à l'aide d'une pyrimidine halogénée, tel que le bromouridine (Halicka et al., 2000). Une autre utilisation est l'utilisation du IdUrd, Idoxuridine (5-Iodo-2'-deoxyuridine), dans des crèmes ophtalmiques afin de traiter les infections des yeux causées par le virus de l'herpès (Seth et al., 2004).

### **I.5     Projet de Recherche**

BrdUrd peut augmenter les cassures de brin radio-induites, *in vitro* et *in vivo*, dans l'ADN des cellules, mais il ne semble pas y avoir de régression tumorale liée à l'utilisation de ce produit en clinique. Ainsi, mieux comprendre les mécanismes de radiosensibilisation du BrdUrd dans l'ADN devrait nous aider à mieux interpréter les échecs des essais cliniques réalisés jusqu'à présent. Nous pensons que le mécanisme de radiosensibilisation doit apparaître très rapidement après irradiation et que ce phénomène doit être gouverné par des réactions physico-chimiques plus que par des événements biologiques. Aussi, nous nous sommes proposé d'étudier le mécanisme de radiosensibilisation d'un oligonucleotide comportant un BrdUrd en milieu de chaîne afin de tenter de mieux le comprendre. Il est maintenant accepté que, par l'irradiation gamma ou photolyse UV, le dommage d'un ADN bromé passe par un intermédiaire, le radical uracyle. Mais, ce que nous ignorons encore, ce sont les conditions de formation de ce radical et les types de dommages qu'il engendre dans l'ADN. Aussi, existe-t-il des conformations ou séquences d'ADN pour lesquelles cet effet radiosensibilisateur pourrait être différent? Quelles sont, *in vitro*, les conditions optimales de l'effet radiosensibilisateur, pour ainsi pouvoir les appliquer *in vivo*? Les mécanismes de radio- et photosensibilisation de l'ADN par le BrdUrd sont-ils comparables? La cassure double brin est-elle le dommage le plus létal engendré par le BrdUrd? Voici, les différentes questions auxquelles nous avons tenté de répondre dans cette étude sur le 5-bromodéoxyuridine.

## II Premier Article

Single strand specific radiosensitization of DNA by Bromodeoxyuridine, S. Cecchini, S. Girouard, M.A. Huels, L. Sanche, D.J. Hunting\*, *Radiation Research* (2004) 62, 604-615.

Dans ce premier article, nous avons démontré le rôle important que peut jouer la structure de l'ADN dans sa radiosensibilisation par le BrdUrd. Nous avons également défini où et quand le BrdUrd pouvait radiosensibiliser efficacement les cellules.

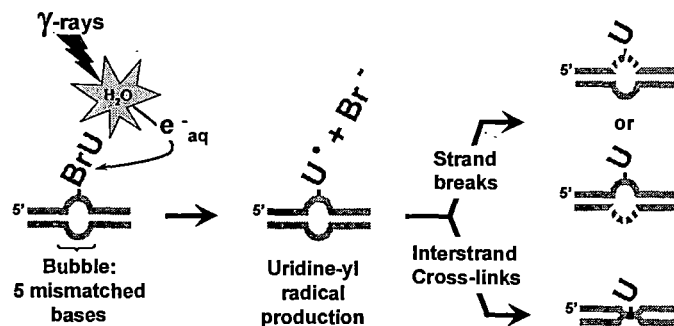
---

L'article publié a été retiré de la thèse (pp. 32-43)
---

### III Second article

Interstrand cross-links: A new type of gamma ray damage in bromodeoxyuridine substituted DNA, S. Cecchini, S. Girouard, M.A. Huels, L. Sanche, D.J. Hunting\*, *Biochemistry* (2005) 44, 1932-40.

Suite au premier article dans lequel nous avons défini les structures de l'ADN «radiosensibilisables» de l'ADN par le BrdUrd, nous avons identifié les types de dommages issus de cette radiosensibilisation (figure III.1).

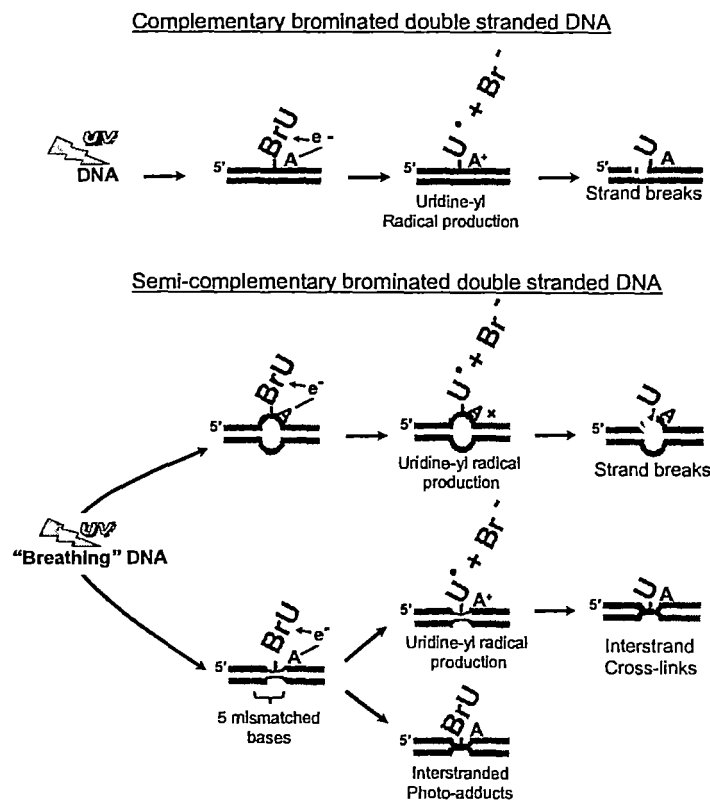


**Figure III.1 :** Action des électrons aqueux sur un ADN bromé semi-complémentaire

#### IV Troisième article

Interstrand cross-link induction by UV radiation in bromodeoxyuridine substituted DNA : dependence on DNA conformation, S. Cecchini, C. Masson, C. La Madeleine, M.A. Huels, L. Sanche, D.J. Hunting\*, soumis à *Biochemistry* (2005).

Dans ce dernier article, nous avons appliqué aux rayonnements UV, les résultats obtenus avec les rayonnements gamma. Cela nous a permis de montrer l'importance de cette structure de bulle dans l'ADN bromé ou non bromé dans la quantité et la qualité de dommages obtenus après photolyse UV (figure III.1).



**Figure IV.1 :** Action des rayonnements UV sur un ADN bromé complémentaire et semi-complémentaire

**Interstrand cross-link induction by UV radiation in bromodeoxyuridine  
substituted DNA : dependence on DNA conformation**

Sylvain Cecchini, Christel Masson, Carole La Madeleine, Michael A. Huels, Léon

Sanche, J. Richard Wagner and Darel J. Hunting\*

*Group in the Radiation Sciences, Department of Nuclear Medicine and Radiobiology,  
Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4*

***ABSTRACT***

DNA interstrand cross-links (ICL) can be induced both by natural products (eg. psoralens + UVA) and chemical agents, some of which are used in chemotherapy (eg. carboplatin and mitomycin C). Here, we report the formation of ICL by UV in brominated DNA, but only for very specific conformations. The quantum yields for strand break and crosslink formation depend on wavelength with a maximum at 280 nm. It is known that the photosensitization of DNA by bromodeoxyuridine (BrdUrd) results mainly from the electron affinity of bromine, leading to the irreversible formation of 2'-deoxyuridin-5-yl radicals (dUrd<sup>•</sup>) upon the addition of an electron from an adjacent adenosine. It is well documented that the photolytic loss of the bromine atom is greatly suppressed in single stranded compared to double stranded DNA. To study this behaviour, we have used two models of BrdUrd mediated sensitization: one involves a DNA duplex containing a bulge, formed by 5 mismatched bases including the BrdUrd, and the other involves completely duplex DNA. UV irradiation induces much higher levels of single strand breaks (ssb) in the completely duplex DNA at the BrdUrd site compared to the DNA with the bulge. However, in

completely hybridized DNA, ssb appear only in the brominated strand, whereas in the bulged duplex DNA, ssb occur on both strands. Most importantly, we also observe formation of interstrand cross-links in bulged duplex DNA at the BrdUrd region. Thus, we propose that UV-irradiation of cells containing BrdUrd incorporated randomly into duplex DNA will create many ssb, whereas BrdUrd present in DNA bulges or open regions in double stranded DNA (transcription bubbles, replication forks), will lead to potentially lethal damage in both strands in the form of ICL. These findings may help explain the potent clinical antiviral activity of IdUrd and BrdUrd (eg for Idoxuridine, used to treat eye infections caused by the herpes virus) and suggest that ICL formation may be a very specific probe for identifying single stranded regions in the DNA of living cells. In addition, this model system provides an excellent means of introducing ICL for studies on their repair or biological consequences.



## INTRODUCTION

ICL repair in cells involves both DNA excision repair as well as recombination, thus increasing the complexity of the repair process (1,2,3). Studies on Fanconi anemia, a rare autosomal recessive disorder characterized by sensitivity to ICL agents have identified seven FA genes involved in cell cycle checkpoints and DNA repair (4,5,6). Very early studies demonstrated that UVB and UVC can induce intrastrand dimers between two pyrimidines on the same strand but more recently, Kypr's group have shown that UVC light can induce cross-links (7,8,9) between the complementary strands of DNA without external chemical agents. Cadet's group have found that the production of these interstrand cross-links is induced by UVC photolysis of dry, A-form DNA (10). In the present study, we report the conformation dependent induction of interstrand cross-links in brominated DNA by UV irradiation. Studies over the last 40 years have demonstrated that 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) is able to radiosensitize (11,12,13,14) and photosensitize cells (15,16,17). Recent studies have demonstrated that BrdUrd is a type I photosensitizer characterized by electron transfer from a nearby adenine to BrdUrd (18). The bromine anion is rapidly ejected leaving two reactive species in DNA, the uracil-5-yl radical and an adenine radical ion. The mechanism of radical stabilization is still under investigation; however, Wang and al., working with short oligonucleotides with a brominated cytosine, have recently found that the mechanism of stabilization may involve the formation of a bond between two radical species creating an intrastrand crosslink between C<sup>Br</sup> and G (19). In the present study, we report that UV-radiation induced ICL are produced most intensively in the mismatched single stranded brominated

region of a double stranded oligonucleotide. In contrast, the production of strand breaks is much more pronounced with brominated, completely double stranded DNA but occurs exclusively in the brominated strand. Interestingly, with a semi-complementary brominated double stranded DNA, strand breaks are generated, albeit at much lower frequency, in both the brominated and non brominated strand within the bubble region.

## MATERIALS AND METHODS

### *Oligonucleotide studies*

#### *5'End labelling the oligonucleotides*

The oligonucleotides shown in figure 1 were purchased from the DNA Synthesis Lab (University of Calgary, AB, Canada).  $^{32}\text{P}$  [ $\gamma$ -ATP] 111 TBq.mmol<sup>-1</sup> and T4 polynucleotide kinase (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) were used for end-labelling oligonucleotides, which were then purified on a G50 sephadex microcolumn, yielding a labelled oligonucleotide which was more than 99.9%  $^{32}\text{P}$  [ $\gamma$ -ATP] free. For each experiment, 100pmole of oligonucleotide are labelled and approximately 75% of the end-labelled oligonucleotide was recovered after purification on a G50 column.

#### Hybridization of oligonucleotides

Hybridization of oligonucleotides with their complementary or semi-complementary strand was performed in 60  $\mu\text{l}$  of solution, using a two-fold excess of the non-radioactive strand. Solutions were heated to 80°C for 5 minutes and then allowed to slowly cool down (2 hours) to room temperature.

**Figure 1 :** Sequences of brominated (strand 1), non-brominated (strand 2), complementary (strand 3) and semi-complementary (strand 4) oligonucleotides showing the location of the single-stranded bubble (double strand 1/4 and 2/4) and the position of the bromodeoxyuridine (B).

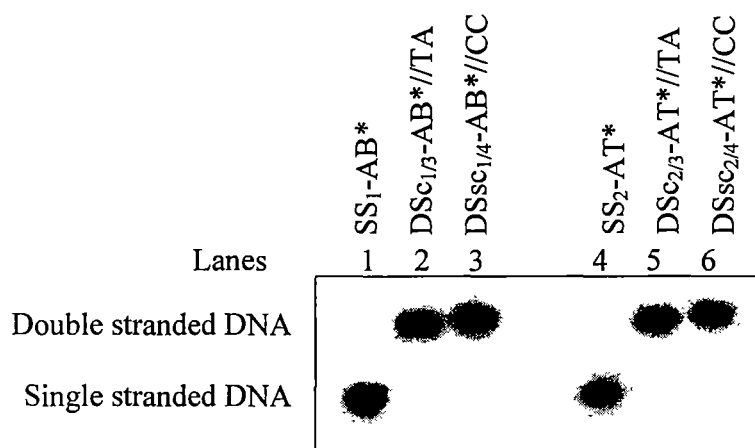
Composition	Strand #	Title and sequence	Abbreviation
<b>oligonucleotide 1/3:</b> 1 Brominated strand 3 Complementary strand	1 3	Brominated complementary double stranded oligonucleotide 5'-C-G-A-G-T-A-C-T-G-C-A-A-B-A-A-C-G-T-G-T-A-C-A-G-C-3' 3'-G-C-T-C-A-T-G-A-C-G-T-T-A-T-T-G-C-A-C-A-C-G-T-C-G-5'	DSc <sub>1/3</sub> -AB//TA SS <sub>1</sub> -AB SS <sub>3</sub> -TA
<b>oligonucleotide 1/4:</b> 1 Brominated strand 4 Semi-complementary strand	1 4	Brominated semi-complementary double stranded oligonucleotide 5'-C-G-A-G-T-A-C-T-G-C-A-A-B-A-A-C-G-T-G-T-A-C-A-G-C-3' 3'-G-C-T-C-A-T-G-A-C-G-C-C-C-C-G-C-A-C-A-C-G-T-C-G-5' <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px 0;">C-C-C-C-C</div> <b>Brominated single stranded region</b>	DSc <sub>1/4</sub> -AB//CC SS <sub>1</sub> -AB SS <sub>4</sub> -CC
<b>oligonucleotide 2/3:</b> 2 Non brominated strand 3 Complementary strand	2 3	Non brominated complementary double stranded oligonucleotide 5'-C-G-A-G-T-A-C-T-G-C-A-A-T-A-A-C-G-T-G-T-A-C-A-G-C-3' 3'-G-C-T-C-A-T-G-A-C-G-T-T-A-T-T-G-C-A-C-A-C-G-T-C-G-5'	DSc <sub>2/3</sub> -AT//TA SS <sub>2</sub> -AT SS <sub>3</sub> -TA
<b>oligonucleotide 2/4:</b> 2 Non brominated strand 4 Semi-complementary strand	2 4	Non brominated semi-complementary double stranded oligonucleotide 5'-C-G-A-G-T-A-C-T-G-C-A-A-T-A-A-C-G-T-G-T-A-C-A-G-C-3' 3'-G-C-T-C-A-T-G-A-C-G-C-C-C-C-G-C-A-C-A-C-G-T-C-G-5' <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin: 5px 0;">C-C-C-C-C</div>	DSc <sub>2/4</sub> -AT//CC SS <sub>2</sub> -AT SS <sub>4</sub> -CC

B :bromodeoxyuracil; T : thymine; A : adenine; G : guanine; C : cytosine; SS : single strand; DS : double strand; c :complementary; sc :semi-complementary (bulge)..

## Verification of hybridization

In order to determine the extent of hybridization for radioactive oligonucleotides with or without a mismatched bubble, samples were separated by electrophoresis in a non-denaturing polyacrylamide gel. Figure 2 shows the migration of single stranded oligonucleotides  $SS_1-AB^*$  and  $SS_2-AT^*$  (lanes 1 and 4) which migrate faster than double stranded oligonucleotides (lanes 2, 3, 5 and 6). The asterisk indicates the radioactive strand. Complementary (lane 2 and 5: oligonucleotides  $DSc_{1/3}-AB^*//TA$  and  $DSc_{2/3}-AT^*//TA$ ) and semi-complementary (lane 3 and 6: oligonucleotides  $DSsc_{1/4}-AB^*//CC$  and  $DSsc_{2/4}-AT^*//CC$ ) double strand, both migrate at the same rate (20). Thus, complete hybridization of labelled oligonucleotides with their complementary and semi-complementary strands occurs under our conditions.

**Figure 2:** Non-denaturing gel electrophoresis of hybridized  $^{32}P$ -labelled oligonucleotides. Lanes 1 and 4 : single stranded oligonucleotides 1\* ( $SS_1-AB^*$ ) and 2\* ( $SS_2-AT^*$ ); lanes 2 and 3 : hybridized oligonucleotides 1\* and 3 ( $DSc_{1/3}-AB^*//TA$ ), 1\* and 4\* ( $DSsc_{1/4}-AB^*//CC$ ) (bubble); lanes 5 and 6 : hybridized oligonucleotides 2\* and 3 ( $DSc_{2/3}-AT^*//TA$ ), 2\* and 4 ( $DSsc_{2/4}-AT^*//CC$ ) (bubble). The asterisk indicates the  $^{32}P$  end-labelled strand



*Strand break and interstrand cross-link detection and quantification*

Denaturing PAGE gel electrophoresis was used to detect interstrand cross-links, as previously described (21,22,23). Following UV irradiation, samples were loaded on a 7 M urea denaturing 20% polyacrylamide gel (35x43 cm) and electrophoresed for 2 hours at 30 watts. A phosphorescent screen was exposed to the gel overnight (12 h) and subsequently analyzed by a fluorescence scanning system, Storm (Molecular Dynamics inc.), using a 100 µm pixel size. The gels were quantified using ImageQuant 5.0 software (Molecular Dynamics Inc.). Molecular weight ladders were generated by random depurination using formic acid at room temperature followed by cleavage at apurinic sites with piperidine at 90 °C.

*Plasmid studies*

*Plasmid and bacteria*

Plasmid PGEM<sup>®</sup>-3Zf(-) (3197 pbs, Promega) is a pUC derivative. Supercoiled plasmid was isolated from 4203 E.coli (Rec A<sup>-</sup> mutant) using a Qiagen extraction kit.

*Media and growth conditions.*

Bacterial cultures were grown at 37 °C in minimal medium (medium A) containing appropriate supplements ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20% 1M glycerol, 0.5% vitamin B1, casamino acids 20% deoxyadenosine 1.25mM. The BrdUrd medium was supplemented with 1.25 µg/ml BrdUrd and 0.5 µg/ml thymidine. The thymidine medium was supplemented with 0.5mg.ml<sup>-1</sup> thymidine. The BrdUrd incorporation ratio in plasmid PGEM<sup>®</sup>-3Zf(-) was determined by HPLC with UVdetection (Waters,

Milford, MA,USA) using a reversed phase column (Waters C18 ODS-AQ 4.6 × 250 nm). The mobile phase was a 50 mM aqueous solution of potassium dihydrogen phosphate pH 5.5 and 8% methanol.

#### *Plasmid strand breaks*

Agarose gel electrophoresis and Sybrgreen staining (Molecular Probes ) were used to detect single and double strand breaks in the plasmid DNA as described in a recent paper by Martin and al. (Martin *et al.*, 2004). After UV irradiation, samples were loaded on a 1% agarose gel electrophoresis (35x43 cm) and electrophoresed for 1 hours at 70 volt, and following staining, samples were analyzed by a fluorescence scanning system at 450nm, using a 100 µm pixel size (Storm, Molecular Dynamics inc.). The gel bands were quantified using ImageQuant 5.0 software (Molecular Dynamics Inc.).

#### *Plasmid Interstrand cross-links*

To quantify ICL formation in plasmid DNA during UV irradiation, the alkaline electrophoretic assay method (Molecular Cloning, Sambrooke and Russel) was used. After UV-irradiation, closed-circular PGEM<sup>®</sup>-3Zf(-) was linearized with *HindIII*, then dephosphorylated with antarctic phosphatase (Biolabs) at 5 U/µl, and finally 5' end labelled using <sup>32</sup>P [γ-ATP] and polynucleotide kinase (see above, *5'End labelling of oligonucleotides*). Labelled DNA was separated by alkaline agarose gel electrophoresis at 3.5 V/cm for 8 hrs following which a phosphorescent screen was

exposed to the gel overnight (12h) and analyzed by Storm using a 100  $\mu\text{m}$  pixel size. The gel was quantified using Image Quant 5.0 software (Molecular Dynamics).

### ***Experimental conditions***

#### ***Bubbling with nitrogen and determination of dissolved oxygen***

To minimize residual dissolved gases that could interact with radicals, oligonucleotide solutions were bubbled with wet nitrogen gas having a stated purity of 99.998% during UV irradiation with a 1000W lamp.

#### ***UV photolysis***

Two methods of photolysis were used in this study. For UVB studies, we used a transilluminator (Spectroline, TC-302, 302 nm - UV lamp) with  $1.3 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{min}^{-1}$  UVB fluence. To remove residual UVC light, we use a homemade pyridine filter, which blocked 50% of the light at 316nm and 99.9% of the light below 290 nm (data not shown). For studies with monochromatic light, we used a 1000W Hg-Xe arc lamp (Spectra-Physics, Oriel Instruments, Stratford, CT) fitted with an infrared filter and monochromator with an adjustable wavelength grating (Spectral Energy Corporation Cherster, Ny). The wavelength accuracy of the monochromator was  $\pm 0.5\text{nm}$  and the energy width was set at  $\pm 2.5 \text{ nm}$ . The photon fluence rate at each wavelength was measured with a 3M Photodyne Optical Mini Meter (Opticon Inc).

*Calculation of Quantum yields for interstrand cross-link and strand break production*

The following formula is used to calculate the quantum yield for each lesion:

Quantum Yield =	$\frac{\text{Percent of the band measured in the gel} \times 75 \text{ pmole of oligonucleotide}}{\text{Fluence} \times E_{\lambda}(\text{photon}) \times (100 - \text{transmittance}) \times \text{Size of the target}}$
-----------------	---

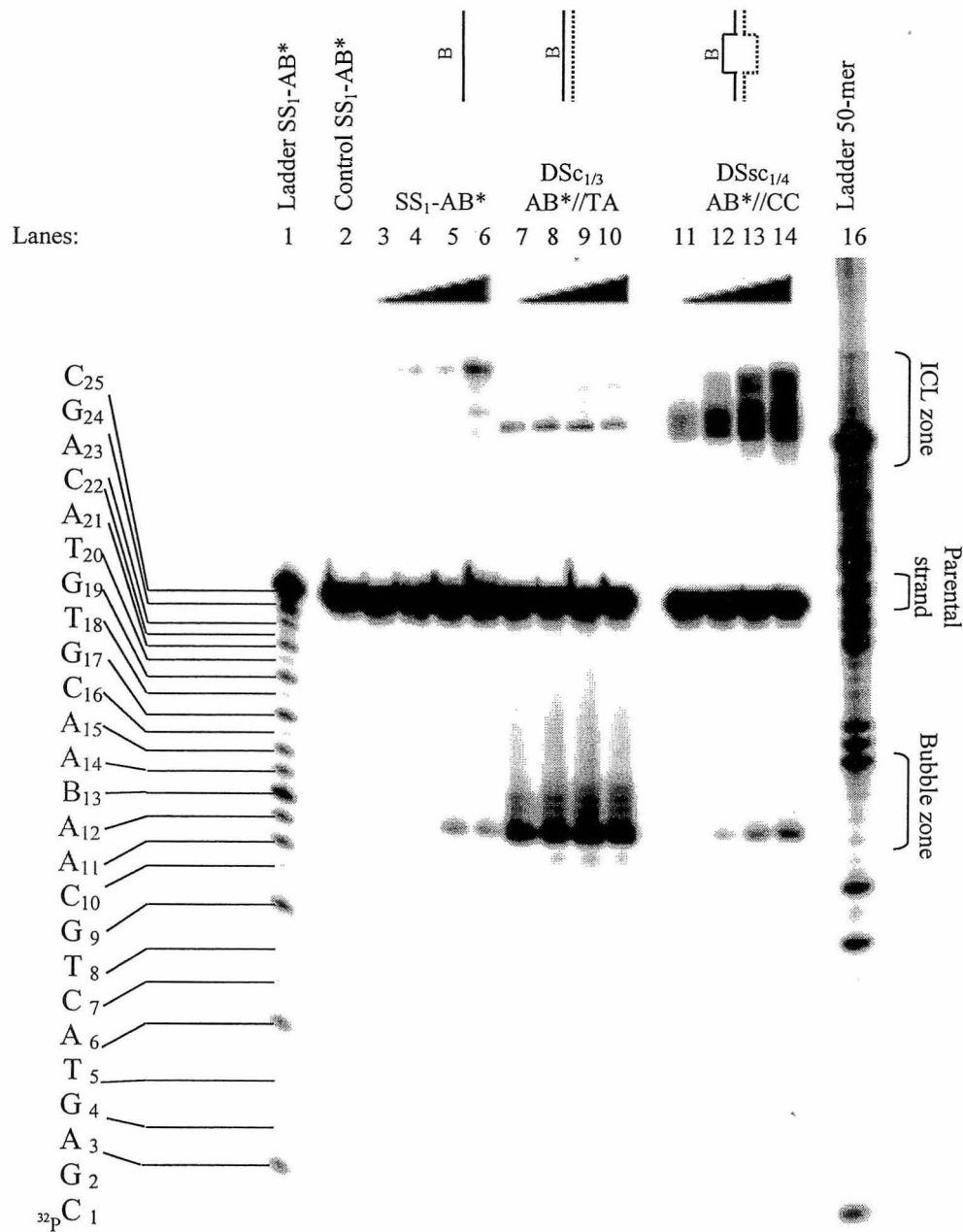
## RESULTS

*UV-B induced breaks and cross-links involving the brominated strand in complementary or semi-complementary double stranded DNA (figure 3)*

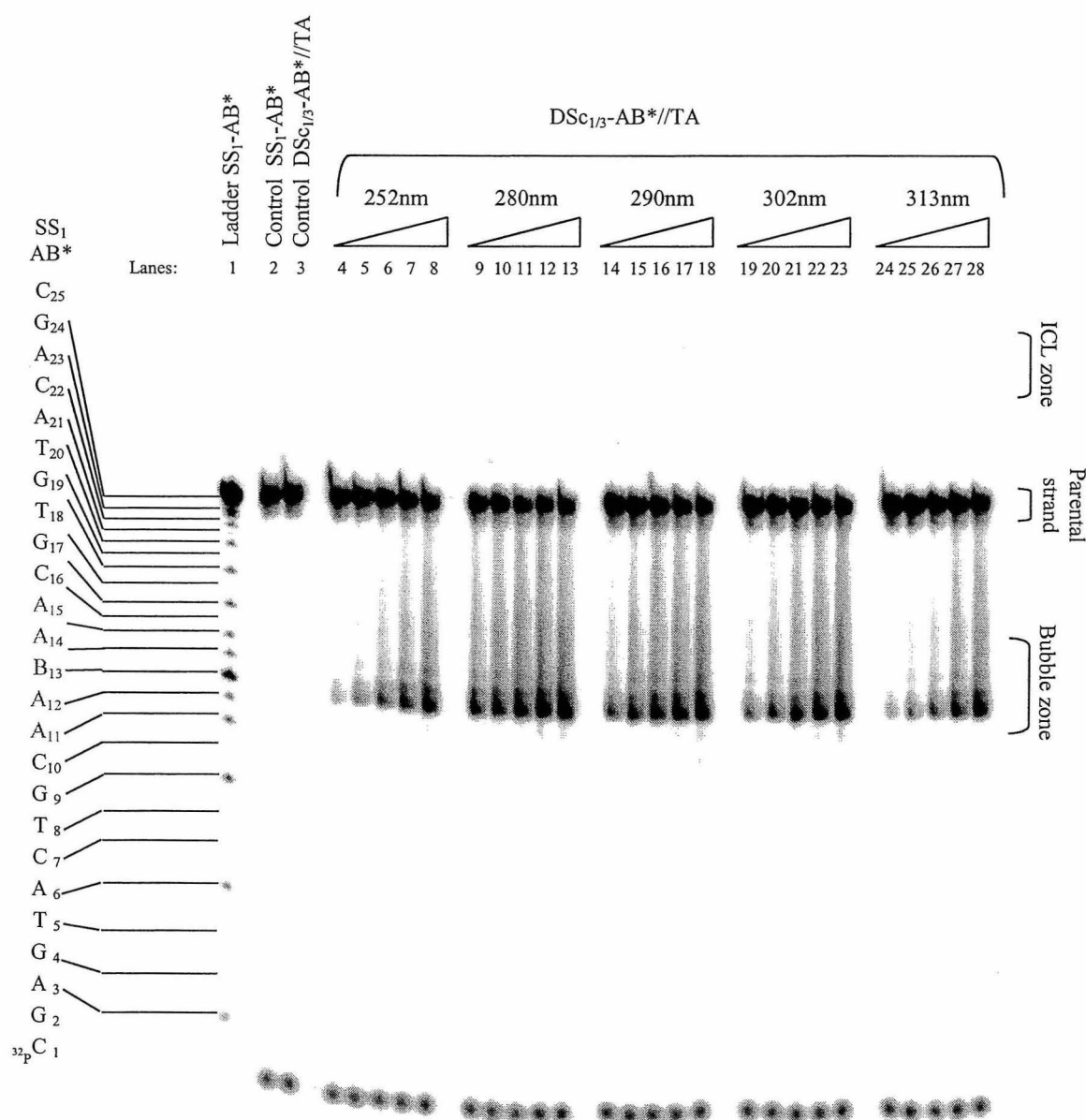
As shown in figure 3, the presence of bromodeoxyuridine at position 13 sensitized very slightly the single stranded oligonucleotide, SS<sub>1</sub>-AB\*, to UV-B radiation induced breakage (lanes 3 to 6). In contrast, the presence of bromodeoxyuridine in completely complementary duplex DNA (DBc<sub>1/3</sub>-AB\*//TA; lanes 7 to 10) greatly enhanced strand break formation 5' of the BrdUrd. When the brominated oligonucleotide, SS<sub>1</sub>-AB\*, was hybridized to a semi-complementary oligonucleotide, SS<sub>4</sub>-CC, resulting in a 5 base pair mismatched bubble, the level of strand breaks was approximately the same as in the single stranded DNA except that new products, consisting of interstrand cross-links, appeared as high molecular weight bands in the denaturing gels (DBsc<sub>1/4</sub>-AB\*//CC; lanes 12 to 15).



**Figure 3:** Formation of single strand breaks and interstrand cross-links in bromodeoxyuridine photosensitized oligonucleotides. Oligonucleotides were photolysed with different doses of UV-B under a nitrogen atmosphere and damage in single-stranded (SS<sub>1</sub>-AB\*), double-stranded (DSc<sub>1/3</sub>-AB\*//TA) or double-stranded with a single-stranded bubble (DSsc<sub>1/4</sub>-AB\*//CC) (nucleotides 11-15 mismatched) were measured. The asterisk indicates the <sup>32</sup>P-labelled strand. In this experiment, the strand containing a BrdUrd (oligonucleotide SS<sub>1</sub>-AB) at position 13 was labelled with <sup>32</sup>P.



**Figure 4:** Formation of single strand breaks and interstrand cross-links in bromodeoxyuridine sensitized oligonucleotides. Oligonucleotides were UV-irradiated with different doses and wavelengths (252, 280, 290, 302 and 313nm) under a nitrogen atmosphere and damage in perfect double stranded DNA (DSc<sub>13</sub>-AB\*//TA) was measured. The asterisk indicates the <sup>32</sup>P-labelled strand. In this experiment, the strand containing a BrdUrd (oligonucleotide SS<sub>1</sub>-AB) at position 13 was labelled with <sup>32</sup>P.



*Wavelength dependence of strand break and ICL formation in brominated complementary (figure 4) or semi-complementary (figure 5) double stranded DNA.*

The presence of bromodeoxyuridine in the complementary double stranded oligonucleotide (figure 4; DBc<sub>1/3</sub>-AB\*//TA) greatly enhances UV-induced strand breakage for each studied wavelength. We observe a maximum of strand breaks at 280nm (figure 4, lanes 9 to 13) but almost no production of ICL at this or any studied wavelength

The presence of bromodeoxyuridine within a single stranded bubble in the semi-complementary double stranded oligonucleotide (figure 5; DBSc<sub>1/4</sub>-AB\*//CC) suppressed UV-induced strand breakage for all studied wavelengths, compared to fully duplex DNA.

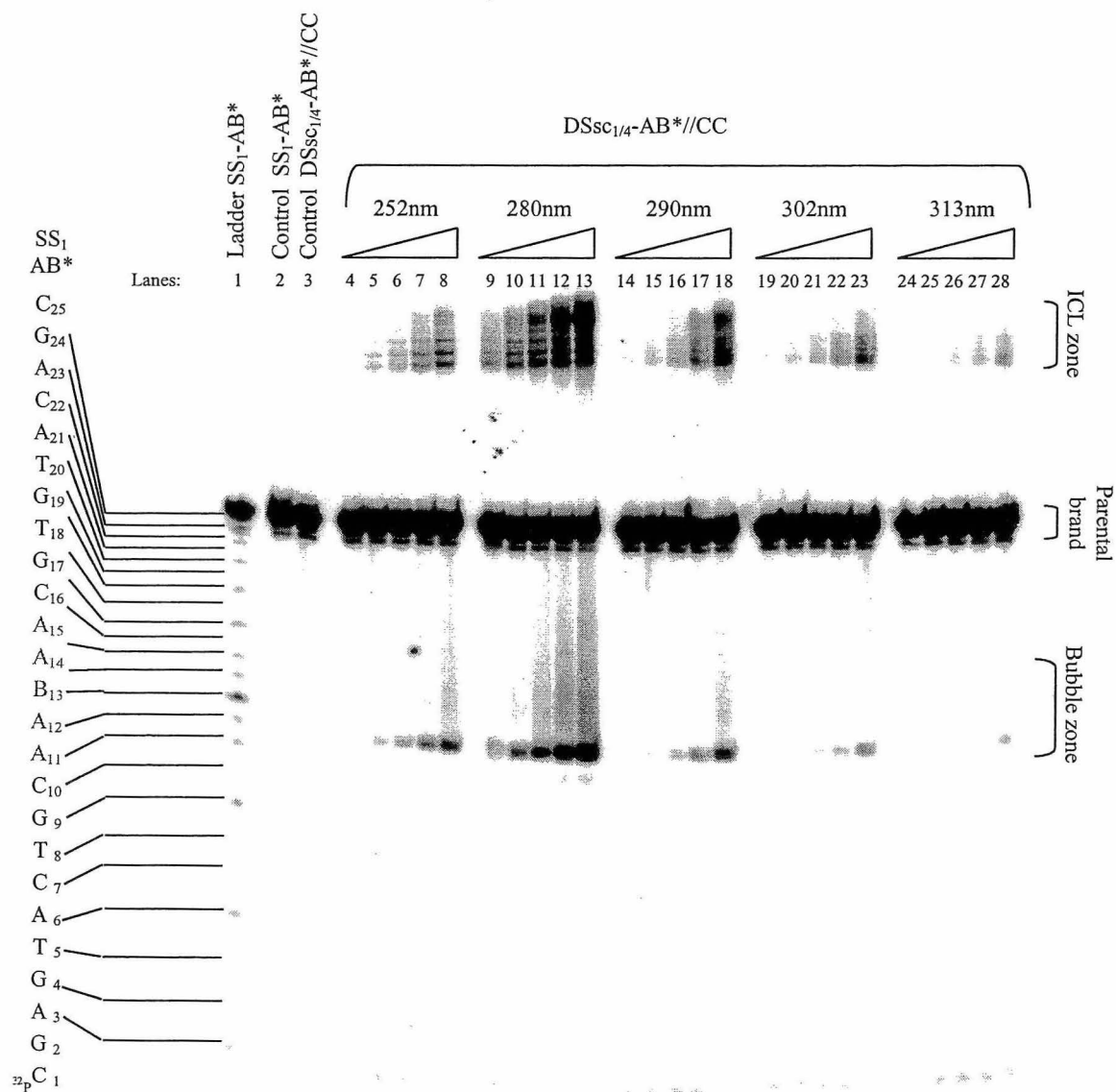
However, substantial ICL production was observed for each wavelength (ICL zone, figure 5). We observe a maximum of ICL and strand break formation at 280nm (figure 5, lanes 9 to 13).

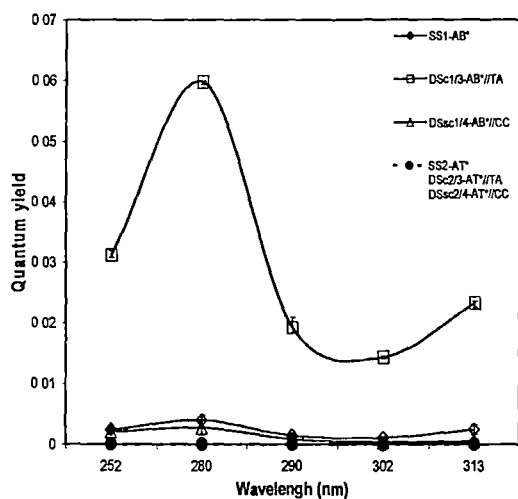
*Quantum yields for strand break and interstrand cross-link formation for different wavelengths and DNA secondary structures. (figure 6 a and b)*

Figure 6 shows the quantum yield of strand breaks (6a) and interstrand cross-links (6b) for each DNA structure (SS, DSc and DSsc) for the brominated (SS<sub>1</sub>-AB\*) and non-brominated oligonucleotide (SS<sub>2</sub>-AT\*).

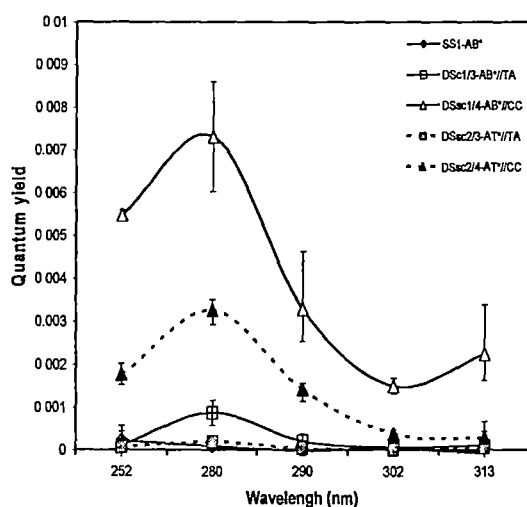
Only brominated duplex DNA gives efficient production of single strand breaks (figure 6a, DSc<sub>1/3</sub>-AB\*//TA, open squares) with a maximum quantum yield at 280nm.

**Figure 5:** Formation of single strand breaks and interstrand cross-links in bromodeoxyuridine sensitized oligonucleotides. Oligonucleotides were UV-irradiated with different doses and wavelength (252, 280, 290, 302, 313nm) under a nitrogen atmosphere and damage in double-stranded with a single-stranded bubble (DSsc<sub>14</sub>-AB\*//CC) (nucleotides 11-15 mismatched) were measured. The asterisk indicates the <sup>32</sup>P-labelled strand. In this experiment, the strand containing a BrdUrd (oligonucleotide SS<sub>1</sub>-AB) at position 13 was labelled with <sup>32</sup>P.





**Figure 6a:** Quantum yields of strand breaks in the brominated and non-brominated DNA as a function of the structure and the wavelength UV-irradiation (252, 280, 290, 302, 313nm).



**Figure 6b:** Quantum yields of ICL in the brominated and non-brominated DNA as a function of the structure and the wavelength UV-irradiation (252, 280, 290, 302, 313nm).

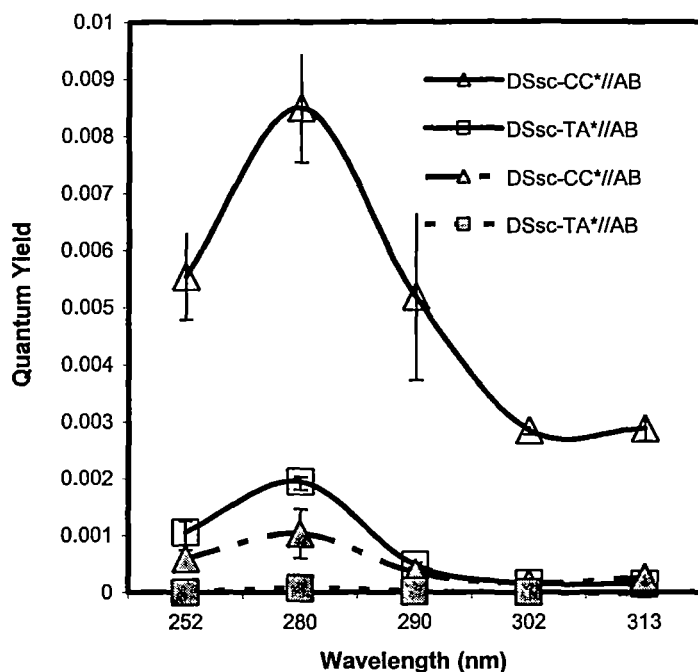
For the brominated complementary double stranded DNA, the maximum quantum yield is 0.06; i.e. about 16 absorbed photons are required to produce one strand break in the brominated complementary double stranded DNA.

In the case of ICL, a maximum quantum yield for each DNA structure for both the brominated and the non-brominated strands occur at 280nm. The ideal condition for the production of ICL is when BrdUrd is present within the bubble zone (DSsc<sub>1/4</sub>-AB\*//CC, open triangles). Interestingly, a substantial but less important production of ICL is obtained when two non-brominated strands are hybridised to form semi-complementary oligonucleotide SS4-CC containing a 5 base pair mismatched bubble (DSsc<sub>2/3</sub>-AT\*//CC, solid triangle). A weak production of ICL is also obtained with brominated complementary double stranded DNA (DSc<sub>1/3</sub>-AB\*//TA, open squares), but no ICL were detected for non-brominated complementary DNA.

*Wavelength specificity for strand break and ICL formation in non-brominated semi-complementary (figure 6c) double stranded DNA.*

Figure 6c shows the quantum yield of strand breaks (dash line) and interstrand cross-links (line) for the non-brominated complementary (SS<sub>3</sub>-TA\*) or semi-complementary strand (SS<sub>4</sub>-CC\*) and for oligonucleotides hybridized with a brominated oligonucleotide (SS<sub>1</sub>-AB). As expected, the quantum yield for ICL formation is independent of the identity of the labelled strand. Nevertheless, strand breaks are observed in the non-brominated strand when hybridized with brominated strand and form a bubble zone, whereas, no quantifiable strand breaks are observed

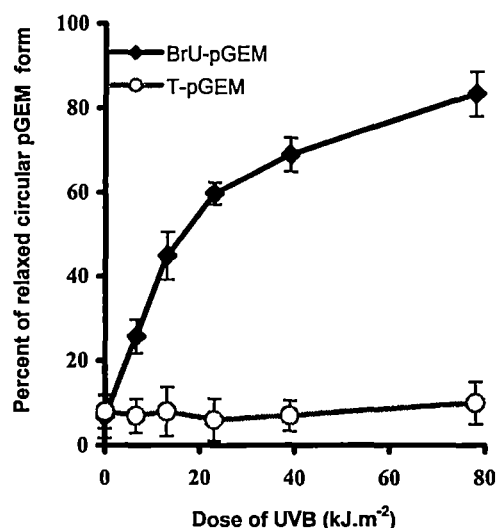
when non-brominated strand are hybridized with a brominated strand and form a perfect double stranded DNA.



**Figure 6c:** Quantum yields of ICL and strand breaks in the non-brominated complementary or semi-complementary strand hybridized with a brominated strand, as a function of the wavelength UV-irradiation (252, 280, 290, 302, 313nm)

*Influence of BrdUrd on strand break formation by UV-B irradiation in pGEM plasmid*

The induction of DNA strand breaks by UV-B (302 nm) in brominated and non-brominated pGEM<sup>®</sup>-3Zf(-) plasmid is shown figure 7. Irradiation of brominated plasmid leads to loss of the supercoiled form and to the formation of relaxed circular (R) molecules. A dose of 80KJ•m<sup>-2</sup> converted 83 % of the supercoiled plasmid to the relaxed circular form while, under the same conditions, no damage was detectable in the non-brominated plasmid.

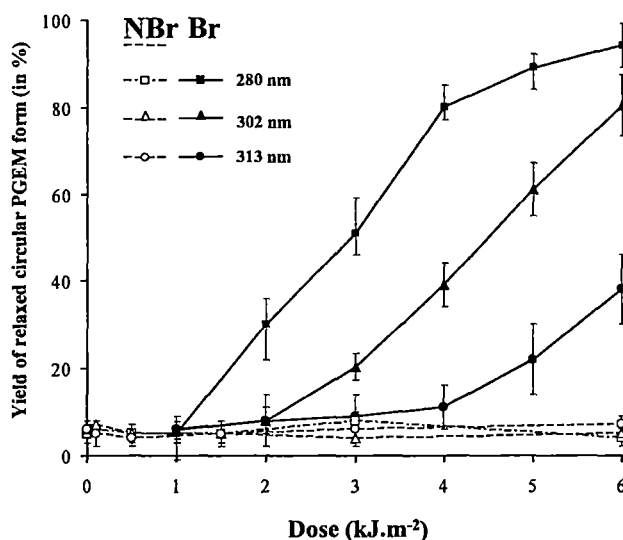


**Figure. 7:** Induction of single strand breaks in plasmid DNA by UV irradiation as a function of dose. Brominated (solid circles, BrU-pGEM) and non-brominated (open circles, T-pGEM) plasmid were irradiated with UVB using a transilluminator and the yields of the relaxed circular form were quantified. Bars represent standard errors

*Wavelength dependence of strand break formation in BrdUrd substituted pGEM plasmid.*

Figure 8 shows the wavelength dependence for strand breakage in brominated and non-brominated pGEM at 280, 302 and 313nm. The efficiency of strand breakage was maximal at 280nm. Under the same conditions, no detectable damage was observed in non-brominated plasmid (open symbols: figure 8).



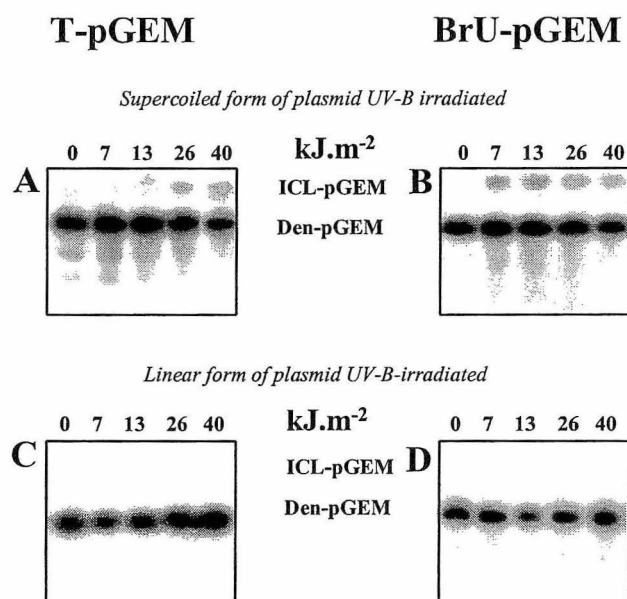


**Figure. 8:** Induction of single double-strand breaks in plasmid DNA by UVB radiation (280, 302, 313 nm). Brominated (Br) and non-brominated (NBr) plasmids were irradiated and the yields of the relaxed circular form were quantified. Bars represent standard errors.

#### *DNA ICL formation in supercoiled brominated plasmid DNA*

The negatively supercoiled form of DNA is more prone to breathing or even denaturing in AT-rich regions compared to the linear form. Thus, based on our results with oligonucleotides, one would expect supercoiling to enhance ICL production during UV-irradiation. To test this hypothesis, interstrand cross-link production in supercoiled and linear plasmids by UV-B irradiation was investigated using an alkaline agarose gel electrophoresis assay (figure 9). Two bands are present: a major, fast migrating band corresponding to the denaturation of nicked plasmid (ss-pGEM) and a second, less intense, slower migrating band (ICL-pGEM), resulting from one or more ICLs. This latter band (ICL-pGEM) is only observable when the supercoiled form of brominated or non-brominated pGEM is UV-B irradiated. Figure 9 Panel B

shows that no ICL DNA is produced when the linear form of brominated or the non-brominated pGEM is UV-B irradiated.



**Figure 9::** Alkaline agarose gel showing ICL DNA in non-brominated and brominated plasmids. The ICL DNA has a lower electrophoretic mobility than denatured single stranded DNA (A, B). In parallel the plasmid was digested by *HindIII* before UVB irradiation (C, D). Panels A and C, non-brominated DNA; panels B and D, brominated DNA.

## DISCUSSION

We have previously hypothesized that radiosensitization of DNA by BrdUrd is most important in open DNA bubble regions which exist under several physiological situations. In these regions, the proximity of the opposite, non-brominated strand as well as the mobility of the bases in the single stranded bubble allows the uridin-5-yl

radical, formed during  $\gamma$ -irradiation by the interaction of an aqueous electron and BrdUrd, to damage bases on the same or the opposite strand and thus to distribute the damage, albeit unequally, between both strands (24). In addition, interstrand crosslinks are formed in these bubble regions (25). In the present work, we investigated the formation of damage in both normal and BrdUrd substituted DNA as a function of the UV-irradiation wavelength and the secondary structure of the DNA, with the goal of comparing the products and the underlying mechanisms involved in strand break and ICL formation for UV and ionizing radiation.

*Our model of open DNA: the bubble*

The DNA bubble in our model system consists of five mismatched bases in the center of a 25 base pair double stranded oligonucleotide, with the BrdUrd at position 13 (figure 1). Thus, the bases on the opposite strands of the single stranded bubble are much more mobile than their base paired neighbours but are still constrained to remain in close proximity by the flanking double stranded portions of the oligonucleotide. This greater mobility confers some single strand properties to these bases (26), thus allowing the formation of either an intercalation structure or an open region (27,28). This mobility could explain a change in the fate of intermediate uracil-5-yl radicals from a pathway that leads to H-atom abstraction and strand cleavage to a pathway that reacts with adjacent bases and produces ICL.

*DNA strand break formation*

It is well known that DNA strand breakage induced by UV-irradiation of brominated DNA arises from electron transfer between an adjacent adenine and the BrdUrd. The formation of stable products from initial transfer depends on several factors, such as forward and back electron transfer rates, radical cation migration, and probably base stacking (29,30,31). Some studies have already shown that radical cation migration along the DNA is suppressed by the presence of mismatched bases or low-energy well traps in the path of migration (32,33). It is evident that base stacking, hydrogen bonding between bases, the presence of metal cations and the degree of solvation can contribute greatly to the conversion of DNA radicals to damage (34,35). In this study, we demonstrate that the conformation and the flexibility of brominated DNA greatly influence the quantity and the quality of damage induced by BrdUrd photolysis.

We observe, in agreement with other studies, that DNA strand break formation in the brominated strand is greatly enhanced in complementary double stranded DNA, and is quenched in single stranded and semi-complementary double stranded DNA. Interestingly, no DNA strand breaks were observed in the complementary non-brominated strand perfectly hybridized with a brominated strand; however an enhancement of breaks of the semi-complementary non-brominated strand was only observed when it was hybridized with a brominated strand to form a single stranded zone around the BrdUrd. The maximum strand break formation for all these conditions is reached at 280nm. Thus, depending on the structure of the DNA, BrdUrd can greatly enhance breakage of only the brominated strand, in perfectly

brominated duplex DNA, or both strands in the case of brominated semi-complementary DNA.

#### *DNA cross-links*

Until recently, intrastrand cross-links between two adjacent non-brominated pyrimidines and DNA strand breakage in brominated DNA were thought to be the most toxic DNA lesions produced by UV-irradiation. However, Kypr's group have recently demonstrated that UVC light can induce interstrand cross-links (36,37,38) between the complementary strands of DNA without external chemical agents. In addition, Cadet et al. have shown, that UVC can create an ICL in A-form DNA and they have characterized this ICL lesion by mass spectroscopy (10). They found that thymines on the opposite strands form an ICL, essentially a spore photoproduct, within UVC irradiated dry DNA. Dehydration either by lyophilisation or by adding a dehydrating agent such as alcohol was essential for ICL formation. We demonstrated here that production of ICL is greatly enhanced by the presence of BrdUrd within a 5 base pair mismatch flanked by double stranded B-form DNA.

The complete mechanism of UV-induced damage of DNA containing BrdU appears to involve two initial reactions of excited BrdUrd (39,40). The well-known pathway of halogenated compounds involves homolytic C-Br bond cleavage of excited BrdUrd leading to intermediate deoxyuridin-5-yl radicals. These radicals can subsequently abstract H-atoms from either the C'1 or C'2 positions of the deoxyribose moiety, although the reaction is complicated by possible rearrangement of sugar radicals (41). Another pathway involves photoinduced electron transfer from the

adjacent base to excited BrdUrd, which generates a radical ion pair. BrdU radical anions subsequently lose Br anions to give deoxyuridin-5-yl radicals. Thus, the damaging radical species in both the homolytic cleavage and electron transfer mediated pathways is likely deoxyuridin-5-yl radicals. A major difference between the two pathways however is that electron transfer produces base radical cations. The latter radicals appear to participate in the overall reaction first by enhancing the rate of H-atom abstraction from C1' by deoxyuridin-5-yl radicals, and secondly, by acting as an oxidizing agent for subsequently formed sugar radicals, thereby converting them to carbocations. Interestingly, electron transfer to excited BrdUrd occurs only when there is a flanking 5'-adenine residue. For example, the presence of guanine, thymine, and cytosine, in place of adenine, greatly reduces strand cleavage in specific oligonucleotides (42,43). Inhibition of electron transfer in DNA in which dGuo was adjacent to BrdUrd has been attributed to rapid recombination of initial radical ion pairs (44).

Electron transfer is probably the most important pathway leading to DNA damage in UV-irradiated DNA with BrdUrd. This is consistent with the more efficient formation of direct strand breaks in UV-irradiated double stranded DNA compared to single stranded DNA (45). Initial electron transfer will be favored in double stranded DNA because of overlap of the  $\pi$  orbitals of BrdUrd and dAdo. In addition, electron transfer induces more direct cleavage of DNA because radical cations of dAdo facilitate H-atom abstraction and the formation of cleavage products (46). In contrast, the formation of breaks by the reaction of solvated electrons with DNA containing BrdUrd is more efficient in single stranded than double stranded DNA (24). In this

case, the capture and loss of bromine anion leads exclusively to deoxyuridin-5-yl radicals. The low yield of breaks in double stranded DNA is likely due to electron transfer of BrdUrd radical anions to other bases.

The presence of a non-complementary bubble in double stranded DNA leads to a decrease in the direct cleavage of DNA, with an increase in the formation of novel interstrand cross-links. The formation of these products indicates a change in the mechanism of DNA damage in regions of double stranded DNA containing bubbles. One possibility is that the reactivity of excited BrdUrd is similar to that in single stranded DNA. On the other hand, one can not rule out electron transfer within the bubble because the helix structure will largely be conserved within this region and thus  $\pi$ -stacking interactions should still occur between adjacent bases. The formation of novel products within the bubble indicates that the chemistry of initial species, i.e. deoxyuridin-5-yl radicals, is diverted from reaction with the deoxyribose moiety on the same strand to reaction with DNA bases on the opposite strand. Previous studies suggest that oxygen can react with deoxyuridin-5-yl radicals and thereby compete with H-atom abstraction on the same strand. Moreover, cross-link products between BrdUrd and pyrimidines have been observed in UV-photolysis of hexanucleotides (47). The presence of a bubble within double stranded DNA provides a new environment in which the radicals of one strand can favorably react with base and perhaps sugar moieties of the other strand. These reactions will not occur in single stranded DNA because the reactants are too dilute in solution to compete with H-atom abstraction. Thus, the mechanism of cross-link formation in bubbles involves the formation of deoxyuridin5-yl radicals by either homolytic cleavage or electron

transfer, followed by addition of these radicals to base moieties on the opposite strand. In the case of electron transfer, the adduct radical of deoxyuridin-5-yl radicals and pyrimidines may undergo oxidation by the adenine radical cation to directly give diamagnetic products.

*Differences between BrdUrd degradation by UV or gamma –irradiation*

We have proposed that the anionic complex formed by an electron and BrdUrd during gamma irradiation of either the free nucleoside or incorporated into single stranded DNA, is probably stabilized by delocalization of the charge into the aromatic ring and by the electro-affinity of the bromine atom leading to the break of the C-Br bond (24,25). However, this electrophilic property of the bromine atom decreases in more complex conjugated systems (48) such as the BrdUrd / deoxyadenosine base pair in double stranded DNA, allowing delocalization of the excess electron towards adenine and onto the oxygen involved in hydrogen bonding. We have supposed that fewer uridine-yl radicals are formed in double stranded than in single stranded DNA as a result of electron transfer to other bases or the medium. In the present work, UV irradiation leads to more strand breaks in brominated double stranded DNA than in semi-complementary brominated double stranded DNA. These results may initially appear to be in contradiction to those obtained with the gamma irradiation in which double stranded DNA is resistant to strand break formation compared to single stranded DNA. For both types of radiation, an additional electron is added to the BrdUrd leading to the formation of a transitory anion  $[\text{BrdUrd}]^-$ . In gamma and UV irradiation, the behavior of this anion is highly dependent on the structure of the DNA;



in the case of gamma radiation there is more release of Br<sup>-</sup> and break strand formation in a semi-complementary double stranded DNA (24) whereas in UV-irradiation, there is more release of Br<sup>-</sup> and break strand formation in a complementary double stranded DNA. The C-Br bond is already weakened by the UV photon absorbed; the presence of the additional electron will further weaken the C-Br bond leading to the release of Br<sup>-</sup> (49,50). In double stranded DNA, the newly formed uracilyl can abstract an H1' or H2' hydrogen from the sugar to yield a radical centered on C1' or C2' of deoxyribose. The radical localized on the sugar can lead respectively to base release or a DNA strand break. In semi-complementary double stranded DNA, the radical uracilyl can equally abstract hydrogen from the sugar moiety; however, under these conditions the uracilyl radical has more mobility than in double stranded DNA and the abstraction of hydrogen can occur on nearby bases of the same strand or bases or even the sugar moiety of the opposite strand. In both gamma and UV irradiation, the quantity of electrons that are available to interact with the BrdUrd is a crucial parameter. Thus, in the case of gamma radiation, oxygen and other molecules can quench solvated electrons while in UV photolysis the presence of the bubble can perturb the transfer of charge along the DNA thus reducing the chance of an electron reaching the excited BrdUrd.

Thus, our results with UV radiation are consistent with those obtained with gamma radiation and in addition, they demonstrate that when the uracilyl radical is produced in double stranded DNA, the strand break will occur on the same strand as the radical.

***Biological implications of our results***

We propose that UV-radiation of cells containing BrdUrd incorporated randomly into duplex DNA will create many ssb, whereas BrdUrd present in DNA bulges or open regions in double stranded DNA (transcription bubbles, replication forks), will lead to lethal damage of both strands in the form ICL. These findings may help explain the potent clinical antiviral activity of IdUrd and BrdUrd (eg for Idoxuridine (51), used to treat eye infections caused by the herpes virus) and suggest that ICL formation may be a very specific probe for identifying single stranded regions in the DNA of living cells. In addition, this model system provides an excellent means of introducing ICL for studies on their repair or biological consequences.

- <sup>1.</sup> Cole, S. (1973) Repair of DNA containing interstrand cross-links in *Escherichia coli*: sequential excision and recombination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1064–1068.
- <sup>2.</sup> Berardini, M., Mackay W., and Loechler, E.L. (1997) A site-specific study of a plasmid containing single nitrogen mustard interstrand cross-link: evidence for a second, recombination independent pathway for the DNA repair of interstrand cross-links, *Biochemistry* 36, 3506–3513.
- <sup>3.</sup> Sasaki, M. S., Takata, M., Sonoda, E., Tachibana, A., and Takeda, S. (2004) Recombination repair pathway in the maintenance of chromosomal integrity against DNA interstrand crosslinks, *Cytogenet. Genome Res.* 104, 28-34.
- <sup>4.</sup> Rothfuss, A., and Grompe, M. (2004) Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway, *Mol. Cell Biol.* 24, 123-34.
- <sup>5.</sup> Pichierri, P., Averbeck, D., and Rosselli, F. (2002) DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11 /NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2531-2546.
- <sup>6.</sup> Zhen, W., Evans, M. K., Haggerty, C. M., and Bohr, V. A. (1993) Deficient gene specific repair of cisplatin-induced lesions in Xeroderma pigmentosum and Fanconi's anemia cell lines, *Carcinogenesis* 14, 919-24.
- <sup>7.</sup> Najedly, K., Kittner, R., Pospisilova, S., and Kypr, J. (2001) Crosslinking of the complementary strands of DNA by UV light: dependence on the oligonucleotide composition of the UV irradiated DNA, *Biochim. Biophys. Acta* 1517, 365-375.
- <sup>8.</sup> Pospisilova, S., and Kypr, J. (1997) UV light-induced crosslinking of the complementary strands of plasmid pUC19 DNA restriction fragments, *Photochem. Photobiol.* 65, 945-948.
- <sup>9.</sup> Nejedly, K., Kittner, R., Kypr, J. (2001) Genomic DNA regions whose complementary strands are prone to UV light-induced crosslinking, *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 216-224.

- <sup>10.</sup> Douki, T., Laporte, G., and Cadet, J. (2003) Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation, *Nucleic Acids Res.* 31, 3134-3142.
- <sup>11.</sup> Dewey, W. C., and Humphrey, R. M. (1965) Increase in radiosensitivity to ionizing radiation related to replacement of thymidine in mammalian cells with 5-bromodeoxyuridine, *Radiat. Res.* 26, 538-553.
- <sup>12.</sup> Sano, K., Hoshino, T., and Nagai, M. (1968) Radiosensitization of brain tumor cells with a thymidine analogue (bromouridine), *J. Neurosurgery* 28, 530-538.
- <sup>13.</sup> Webb, C. F., Jones, G. D., Ward, J. F., Moyer, D. J., Aguilera, J. A., and Ling, L. L., (1993) Mechanisms of radiosensitization in bromodeoxyuridine-substituted cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 695-705.
- <sup>14.</sup> Ling, L. L., and Ward, J. F. (1990) Radiosensitization of Chinese hamster V79 cells by bromodeoxyuridine substitution of thymidine: enhancement of radiation-induced toxicity and DNA strand break production by monofilar and bifilar substitution, *Radiat. Res.* 121, 76-83.
- <sup>15.</sup> Taguchi T., Shiraishi Y. (1989) Increased sister-chromatid exchanges (SCEs) and chromosomal fragilities by BrdU in a human mutant B-lymphoblastoid cell line. *Mutat Res.* 211, 43-49.
- <sup>16.</sup> Ribas M., Korenberg J. R., Peretti D., Pichiri G., Stockert J. C., Gosalvez J., Mezzanotte R. (1994) Sister chromatid differentiation in 5-bromo-2'-deoxyuridine-substituted chromosomes: a study with DNA-specific ligands and monoclonal antibody to histone H2B. *Chromosome Res.* 2, 428-38.
- <sup>17.</sup> Wojcik A, von Sonntag C, Obe G. (2003) Application of the biotin-dUTP chromosome labelling technique to study the role of 5-bromo-2'-deoxyuridine in the formation of UV-induced sister chromatid exchanges in CHO cells. *J Photochem Photobiol B.* 69, 139-44.
- <sup>18.</sup> Sugiyama H, Tsutsumi Y, Saito I (1990) Highly sequence-selective photoreaction of 5-bromouracil-containing deoxyhexanucleotides,; *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6720-6721
- <sup>19.</sup> Zeng, Y.; Wang, Y. (2004) Facile Formation of an Intrastrand Cross-Link Lesion between Cytosine and Guanine upon Pyrex-Filtered UV Light Irradiation of d(<sup>B</sup>CG) and Duplex DNA Containing 5-Bromocytosine *J. Am. Chem. Soc.* 126, 6552-6553.
- <sup>20.</sup> Bhattacharyya, A., Lilley, D. M. (1989) The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles), *Nucleic Acids Res.* 17, 6821-6840.
- <sup>21.</sup> Gamber, H., Piette, J., and Hearst, J. E. (1984) Efficient formation of a crosslinkable HMT monoadduct at the Kpn I recognition site, *Photochem. Photobiol.* 40, 29-34.
- <sup>22.</sup> Teng, S. P., Woodson, S. A., and Crothers, D. M. (1989) DNA sequence specificity of mitomycin cross-linking, *Biochemistry* 28, 3901-3907.
- <sup>23.</sup> Millard, J. T., Weidner, M. F., Kirchner, J. J., Ribeiro, S., and Hopkins, P. B. (1991) Sequence preferences of DNA interstrand crosslinking agents: quantitation of interstrand crosslink locations in DNA duplex fragments containing multiple crosslinkable sites, *Nucl. Acids Res.* 19, 1885-1891.
- <sup>24.</sup> Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M. A., Sanche, L., and Hunting, D. J. (2004) Single strand specific radiosensitization of DNA by bromodeoxyuridine, *Radiat. Res.* 162, 604-15
- <sup>25.</sup> Cecchini S., Girouard S., Huels M. A., Sanche L. and Darel J. H., (2005) Interstrand cross-links: a new type of gamma ray damage in bromodeoxyuridine substituted DNA, *Biochemistry*, 44, 1932-40..
- <sup>26.</sup> Bhattacharyya, A., and Lilley, D. M. (1989) The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles), *Nucleic Acids Res.* 17, 6821-6840
- <sup>27.</sup> Chou, S.-H., Chin, K. H., and Wang, A. H. (2003) Unusual DNA duplex and hairpin motifs, *Nucleic Acids Res.* 31, 2461-2474.

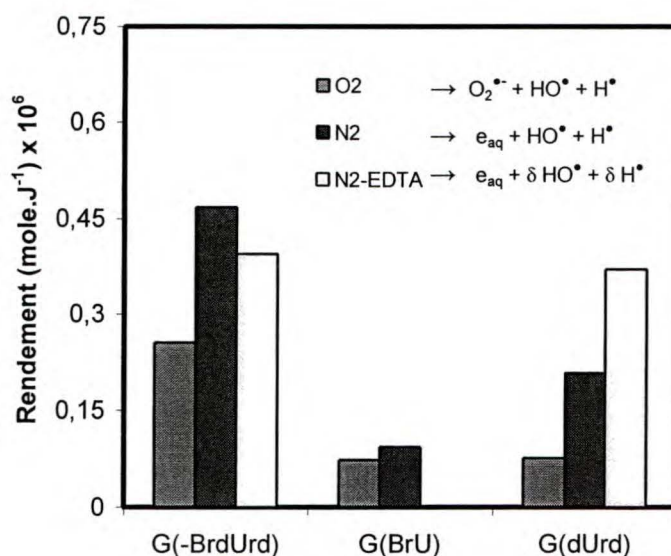
28. Shepard, W., Cruse, W. B., Fourme, R., de la Fortelle, E., Prange, T. (1998) A zipper-like duplex in DNA: the crystal structure of d(GCGAAAGCT) at 2.1 Å resolution, *Structure*, **6**, 849-861.
29. Colson A. O., Sevilla M. D. (1995) Elucidation of primary radiation damage in DNA through application of ab initio molecular orbital theory. *Int J Radiat Biol.* **67**, 627-45.
30. Hutter M.; Clark T. (1996) On the Enhanced Stability of the Guanine-Cytosine Base-Pair Radical Cation; *J. Am. Chem. Soc.*; **118**, 7574-7577.
31. Saito I.; Nakamura T.; Nakatani K.; Yoshioka Y.; Yamaguchi K.; Sugiyama H. (1998) Mapping of the Hot Spots for DNA Damage by One-Electron Oxidation: Efficacy of GG Doublets and GGG Triplets as a Trap in Long-Range Hole Migration *J. Am. Chem. Soc.*; **120**, 12686-12687
32. SO Kelley, EM Boon, JK Barton, NM Jackson, and MG Hill (1999) Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA *Nucleic Acids Res.* **27**, 4830 - 4837
33. Okada A., Yokojima S., Kurita N., Sengoku Y., Tanaka S. (2003) Charge transfer in duplex DNA containing mismatch *J. Mol. Struct.:TheoChem.* **630**, 283-290
34. Falcone J.M., Becker D., Sevilla M.D., Swarts S.G. (2005) Products of the reactions of the dry and aqueous electron with hydrated DNA: hydrogen and 5,6-dihydropyrimidines *Radiat. Phys. Chem.* **72**, 257-264.
35. Ambroz H.B., Kemp T.J., Rodger A., Przybytniak G. (2004) Ferric and ferrous ions: binding to DNA and influence on radiation-induced processes, *Radiat. Phys. Chem.* **71**, 1023-1030.
36. Najedly, K., Kittner, R., Pospisilova, S., and Kypr, J. (2001) Crosslinking of the complementary strands of DNA by UV light: dependence on the oligonucleotide composition of the UV irradiated DNA, *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 365-375.
37. Pospisilova, S., and Kypr, J. (1997) UV light-induced crosslinking of the complementary strands of plasmid pUC19 DNA restriction fragments, *Photochem. Photobiol.* **65**, 945-948.
38. Nejedly, K., Kittner, R., Kypr, J. (2001) Genomic DNA regions whose complementary strands are prone to UV light-induced crosslinking, *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 216-224.
39. Cook, G. P.; Greenberg, M. M. (1996) A Novel Mechanism for the Formation of Direct Strand Breaks upon Anaerobic Photolysis of Duplex DNA Containing 5-Bromodeoxyuridine; *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10025-10030
40. Sugiyama H., Tsutsumi Y., Saito I. (1990) Highly sequence-selective photoreaction of 5-bromouracil-containing deoxyhexanucleotides *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6720-6721
41. Sugiyama H., Fugimoto K., Saito I. (1996). Evidence for intrastrand C2' hydrogen abstraction in photoirradiation of 5-halouracil-containing oligonucleotides by using stereospecifically C2'-deuterated deoxyadenosine. *Tetrahedron Lett.* **37**, 1805-1808.
42. Ito, T., Rokita, S. E. (2004) Reductive Electron Injection into Duplex DNA by Aromatic Amines *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15552-15559.
43. Chen, T., Cook G. P., Koppisch A. T., Greenberg M. M. (2000) Investigation of the Origin of the Sequence Selectivity for the 5-Halo-2'-deoxyuridine Sensitization of DNA to Damage by UV-Irradiation *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3861-3866
44. Chen, T.; Cook, G. P.; Koppisch, A. T.; Greenberg, M. M. (2000) Investigation of the Origin of the Sequence Selectivity for the 5-Halo-2'-deoxyuridine Sensitization of DNA to Damage by UV-Irradiation *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3861-3866
45. Cook G. P., Chen T., Koppisch A. T., Greenberg M. M. (1999) The effects of secondary structure and O<sub>2</sub> on the formation of direct strand breaks upon UV irradiation of 5-bromodeoxy-uridine-containing oligonucleotides *Chem. Biol.* **6**, 451-459
46. Hatano K, Sugiyama H, Saito I., (1995) Photoreaction of 5'-halouracil-containing DNA. A novel photoproduct at 5'BrU-pyrimidine-3' sequence. *Nucl. Acids Symp Ser.* **34**, 31-2.
47. Hatano K., Sugiyama H., Saito I. (1996) Photoreaction of 5'-halouracil-containing DNA. A novel photoproduct at 5'BrU-pyrimidine-3' sequence *Nucleic Acids Symposium Series. Nucl. Acids Sym. Ser.* **34**, 31-33.
48. X. Li, M. D. Sevilla and L. Sanche, (2003) Density Functional Theory Studies of Electron Interaction with DNA: Can Zero eV Electrons Induce Strand Breaks? *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8916-8920

- 
- <sup>49</sup>. Dietz T. M., Von Trebra R. J., Swanson B. J., Koch T. H. (1987) Photochemical coupling of 5-bromouracil (BU) to a peptide linkage. A model for BU-DNA protein photocrosslinking *J. Am. Chem. Soc.* *109*, 1793-1797.
- <sup>50</sup>. Ito S., Saito I., Matsuura T. (1980) Acetone-sensitized photocoupling of 5-bromouridine to tryptophan derivatives via electron-transfer process *J. Am. Chem. Soc.*; *102*; 7535-7541.
- <sup>51</sup>. Seth A. K., Misra A., Umrigar D. (2004) Topical liposomal gel of idoxuridine for the treatment of herpes simplex: pharmaceutical and clinical implications. *Pharm Dev Technol.* *9*, 277-89.

## V Discussion

### V.1 Comment a-t-on choisi les conditions d'irradiation?

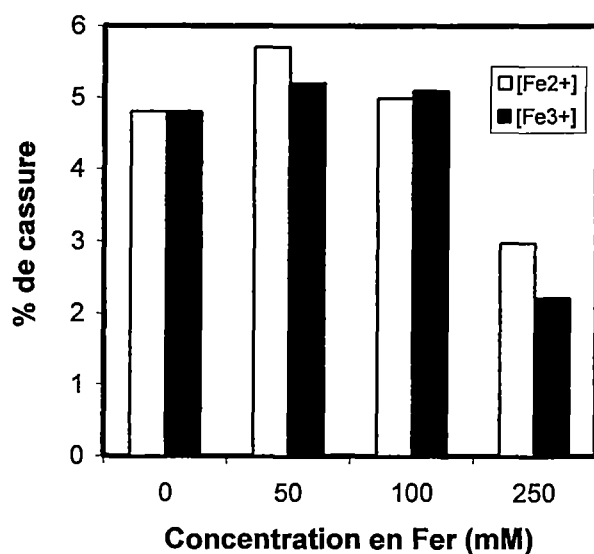
Des expériences sur le nucléoside BrdUrd ont été réalisées afin de définir les meilleures conditions d'irradiation pour le rendement de dégradation le plus efficace. Ces expériences, comme de nombreuses études (Gilbert et al., 1967; . Zimbrick et al., 1969), ont montrés que le rendement de dégradation de ce produit (BrdUrd) et le rendement de formation de déoxyuridine (dUrd) sont augmentés proportionnellement à la quantité d'électrons aqueux générés dans le milieu (figure V.1).



**Figure V.1:** Rendement radiolytique (G) en mol.j<sup>-1</sup> de dégradation du BrdUrd ou de formation de BrU ou dUrd en fonction des capteurs présent dans le milieu (■ milieu avec O<sub>2</sub>; ■ milieu sans O<sub>2</sub> (remplacé par N<sub>2</sub>); □ milieu sans O<sub>2</sub> et avec EDTA).

En absence d'oxygène, la quantité d'électrons aqueux disponibles dans le milieu est très favorisée (von Sonntag, 1983). Ainsi, une augmentation de la production de

dUrd, via la formation du radical déoxyuridinyle (Greenstock et Whitehouse, 1992) ( $\text{dUrd}^\bullet$ ) est observée (figure V.1). En ajoutant un capteur de  $\text{HO}^\bullet$  à la solution désaérée précédente, on observe aussi l'augmentation des rendements de formation de dUrd. L'EDTA (Lati et Meyerstein, 1978), un capteur de  $\text{HO}^\bullet$ , peut agir de trois manières sur l'accroissement du rendement de formation de dUrd. En premier lieu, il capte les radicaux hydroxyles, évitant une recombinaison radicalaire entre l'électron et le radical  $\text{HO}^\bullet$  et augmentant ainsi la quantité d'électrons aqueux disponible dans le milieu. En second lieu, l'EDTA peut empêcher l'attaque des  $\text{HO}^\bullet$  sur le sucre et ainsi éviter la décomposition du produit nouvellement formé dUrd en uracile. La troisième caractéristique de l'EDTA pouvant expliquer son implication dans l'augmentation du rendement de production d'électrons aqueux et ainsi son implication dans l'augmentation du rendement de dUrd formée, est son caractère chélateur de fer dissous.



**Figure V.2:** Cassures de brin en fonction du Fer dissous (  $\square$   $\text{Fe}^{2+}$ ;  $\blacksquare$   $\text{Fe}^{3+}$ ) en présence de 25mM d'EDTA.

Ainsi, les électrons produits seraient plus disponibles pour interagir avec la molécule cible qu'avec le fer dissous (figure V.1). On constate ainsi une bonne corrélation entre le nombre d'électrons aqueux produits par radiolyse et le rendement de formation de dUrd.

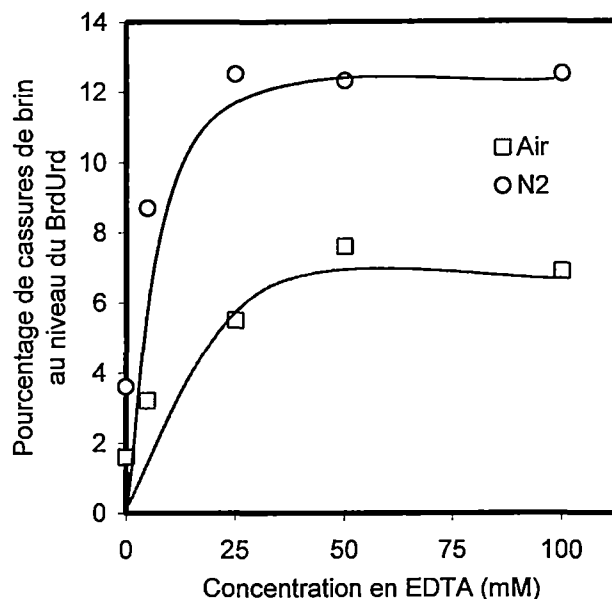
Ces résultats ont orienté le choix des conditions d'irradiation pour nos expériences sur les oligonucléotides. Ainsi, pour observer une radiosensibilisation efficace des oligonucléotides ayant un BrdUrd incorporé, il semble adéquat d'augmenter le nombre d'électrons aqueux dans le milieu en utilisant une solution désaérée, en présence d'un capteur de  $\text{HO}^\bullet$  comme l'EDTA.

## **V.2 Quels sont les résultats originaux obtenus avec un oligonucléotide dont une thymine a été substituée par un BrdUrd?**

Au cours de nos expériences sur « l'ADN bromé », nous avons pu observer une augmentation des dommages radio-induits au site d'incorporation de la base halogénée. Ce phénomène est cependant très dépendant des conditions d'irradiation utilisées et de la structure de l'ADN.

Des expériences nous ont permis d'optimiser la concentration en EDTA afin d'obtenir le meilleur rendement de cassures avec le moins d'EDTA possible. Les cassures de brin étaient maximales et atteignaient un plateau avec 25mM d'EDTA (figure V.3). Des concentrations en EDTA supérieures à 25mM n'augmentaient plus le pourcentage de cassure au niveau du BrdUrd. Nous avons donc considéré que la captation des radicaux hydroxyles et la chélation des atomes de fer dissous par l'EDTA étaient optimales à cette concentration.

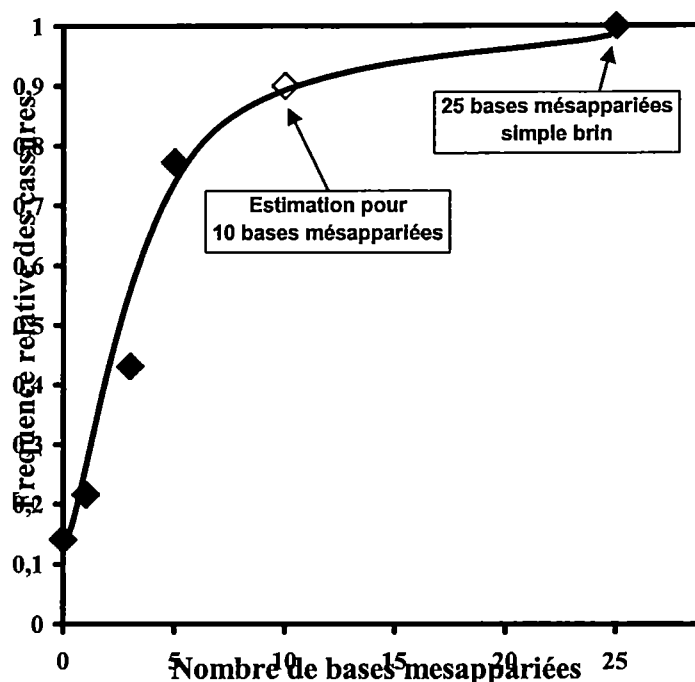




**Figure V.3:** cassures simples brins en fonction de la concentration d'EDTA en présence (□) ou en absence d'oxygène (○).

Dans nos conditions expérimentales (atmosphère d'azote et EDTA 25mM), nous avons pu observer que la radiosensibilisation d'un brin d'ADN ne dépend pas uniquement de la présence d'électrons aqueux dans le milieu, mais également de la structure de l'ADN. Ainsi, dans notre premier article, nous démontrons que le BrdUrd est capable de radiosensibiliser un ADN simple brin, tandis qu'il est incapable de radiosensibiliser un ADN double brin parfaitement hybridé. Pour retrouver ses propriétés radiosensibilisantes, le BrdUrd doit se retrouver dans une zone dite plus relâchée, qui respire. Afin de bien contrôler l'ouverture des deux brins d'ADN autour du BrdUrd, cinq bases comprenant le BrdUrd sont non appariées. Les bases dans cette zone se retrouvent ainsi dans la même situation que dans un simple brin, ce qui permet au BrdUrd de retrouver son caractère radiosensibilisateur. De nos expériences, nous avons pu tirer une relation proportionnelle entre le dommage dû au BrdUrd et le

nombre de bases mésappariées (figure V.4). Les résultats obtenus avec différentes tailles de bulles, nous ont permis d'estimer que 7 à 10 bases mésappariées devraient être la condition où la quantité de cassure au site du BrdUrd serait maximale et près des valeurs obtenues avec un simple brin bromé.



**Figure V.4:** Cassure de brin relative autour du BrdUrd en fonction du nombre bases mésappariées

Le BrdUrd est donc un bon radiosensibilisateur capable de sensibiliser non seulement le brin bromé, mais également le brin hybridé semi-complémentaire non-bromé. Ainsi, dans ces mêmes conditions d'irradiation, la structure de l'ADN peut influencer la quantité de dommages provoqués par le BrdUrd, mais également influencer le type de dommages produits à ce site. Un nouveau dommage radio-induit a ainsi été identifié comme étant un dimère interbrin apparaissant dans les zones mésappariées bromées.

Contrairement aux rayonnements gamma, les rayonnements UVB et C induisent plus de cassures sur le brin portant le BrdUrd lorsque ce brin est parfaitement hybridé à son brin complémentaire. Néanmoins, la formation de dimères interbrins et les dommages aux deux brins ne sont favorisés que dans un contexte où l'ADN est semi-complémentaire.

**Tableau V.1:** Influence de la structure de l'ADN sur les cassures du brin bromé en fonction du rayonnement.

	Cassures			Dimères interbrins
Rayon gamma	SB >	DBsc >>	DBc	DBsc >> DBc
UV	SB <	DBsc <<	DBc	DBsc >> DBc

Aussi, le BrdUrd apparaît comme beaucoup plus réactif vis-à-vis des rayonnements gamma ou UV lorsqu'il se situe dans une zone ouverte d'un ADN. Cette localisation lui permet d'engendrer des dommages plus dispersés apparaissant sur le brin bromé, mais également sur le brin hybridé non-bromé, ce qui favorise la formation d'une lésion très toxique, les dimères interbrins.

### V.3 Comment les électrons aqueux interagissent avec le BrdUrd?

Il est bien établi maintenant que les dommages au BrdUrd sont fortement liés à la présence d'électrons aqueux (Rivera et Schuler, 1983) ou d'électrons secondaires (Klyachko et al., 1999; Abdoul-Carime et al., 2001). Le temps d'interaction entre l'électron et la particule cible, le BrdUrd dans notre cas, et la présence d'un bon groupement électrophile partant, tel que l'atome de brome, sont deux facteurs qui font du BrdUrd une molécule facilement dégradée par les électrons. Dans le cas d'un électron aqueux, le temps d'interaction avec la molécule cible va dépendre de la

capacité des électrons de la molécule à se délocaliser et ainsi stabiliser cet excès d'électron. Dans le cas du BrdUrd, une délocalisation des électrons est possible au sein du noyau aromatique, ce qui conduira à une réorganisation autour de l'atome le plus électrophile sera possible : dans notre cas, ce sera l'atome de brome.

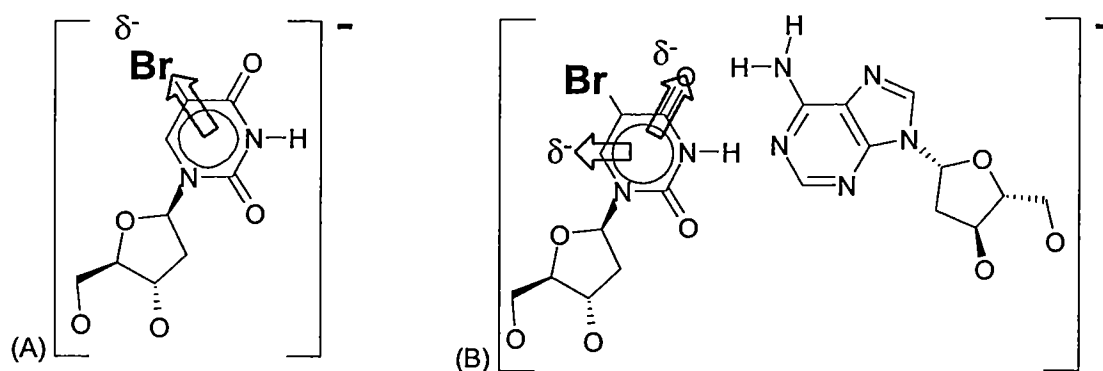
**Tableau V.2 :** Électronégativité et affinité électronique des différents atomes constituant les bases pyrimidines

Atome	N	O	Br	C
EA (kJ.mol <sup>-1</sup> )	-6,75	140,96	324,67	121,86
Électronégativité	3,04	3,44	2,96	2,55

L'excès d'électron est ainsi stabilisé assez longtemps pour permettre aux électrons de l'atome de brome de se réorganiser : ceci favorise l'attraction d'un électron supplémentaire pour combler la couche de valence de cet atome. Par la suite, le brome attire les deux électrons du lien C-Br. Cette liaison se brise à son tour et forme deux molécules, l'anion de brome et le radical uridinyle.

L'action des électrons aqueux semble se vérifier pour le BrdUrd « libre », soit sous forme de nucleoside soit incorporé dans un ADN simple brin. Dans ce dernier cas, les nucléosides voisins du BrdUrd, étant lié entre eux via un groupement phosphate sur les sucres, ne semblent pas ou peu influencer la réactivité de l'anion transitoire, [BrdUrd]<sup>-</sup>. Cependant, cette voie de dégradation du BrdUrd diminue ostensiblement dans un ADN double brins, car cette base bromée est impliquée dans des liaisons hydrogènes avec l'adénine. La distribution du nuage électronique de l'anion [BrdUrd]<sup>-</sup> est différente dans un simple brin ou dans un double brin d'ADN (Li et al., 2003; Gantchev et al., 2005). La densité électronique la plus élevée se situe sur

l'atome de brome pour l'anion  $[\text{BrU}]^-$  en solution, favorisant ainsi le départ de l'anion  $\text{Br}^-$ . Cependant lorsque l'anion  $[\text{BrU}]^-$  est impliqué dans des liaisons hydrogènes, la distribution électronique change : la probabilité de trouver l'électron excédentaire sur l'atome de brome est plus faible que celle de le trouver sur l'atome d'oxygène impliqué dans la liaison hydrogène avec l'adénine ou le carbone en position 6 de cette molécule. Cette nouvelle distribution favorise la diffusion de l'électron excédentaire aux autres bases de l'ADN et/ou au milieu (Voityuk et al., 2001; Cai et al., 2002) ou la protonation du carbone 6 (Hutterman, 1991).

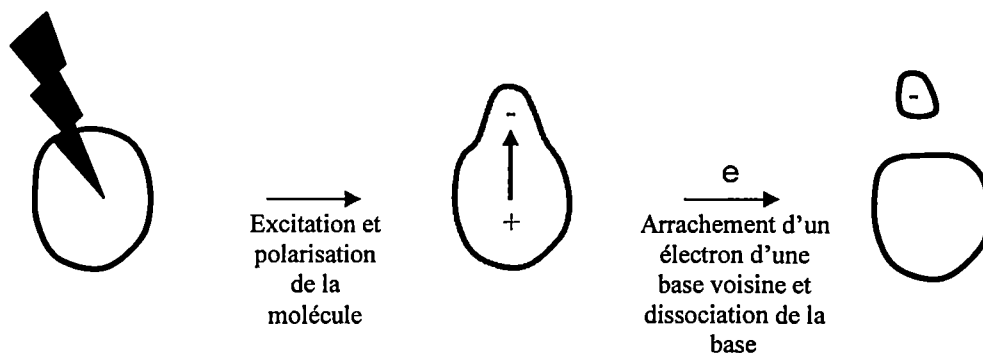


**Figure V.5 :** Délocalisation de l'électron et probabilité de présence sur les atomes sur le BrdUrd en simple brin (A) ou en double brin, hybridé avec une adénine (B) (Les flèches indiquent sur quelle atome l'électron restent le plus longtemps)

#### V.4 Quels sont les mécanismes impliqués dans la sensibilisation d'un ADN par la lumière UV et en présence de BrdUrd?

Le départ de l'atome de brome sur le nucléotide BrdUrd incorporé dans un ADN est lié à l'arrachement d'un électron sur une adénine proximale (Sugiyama et al., 1990). Ors de la radiolyse ou de la photolyse du BrdUrd, il y a présence d'un électron excédentaire qui déstabilise la liaison C-Br (Bühler, 1973; Klyachko et al., 1999). Cependant, nos premiers résultats, obtenus en radiolyse gamma, montraient peu de

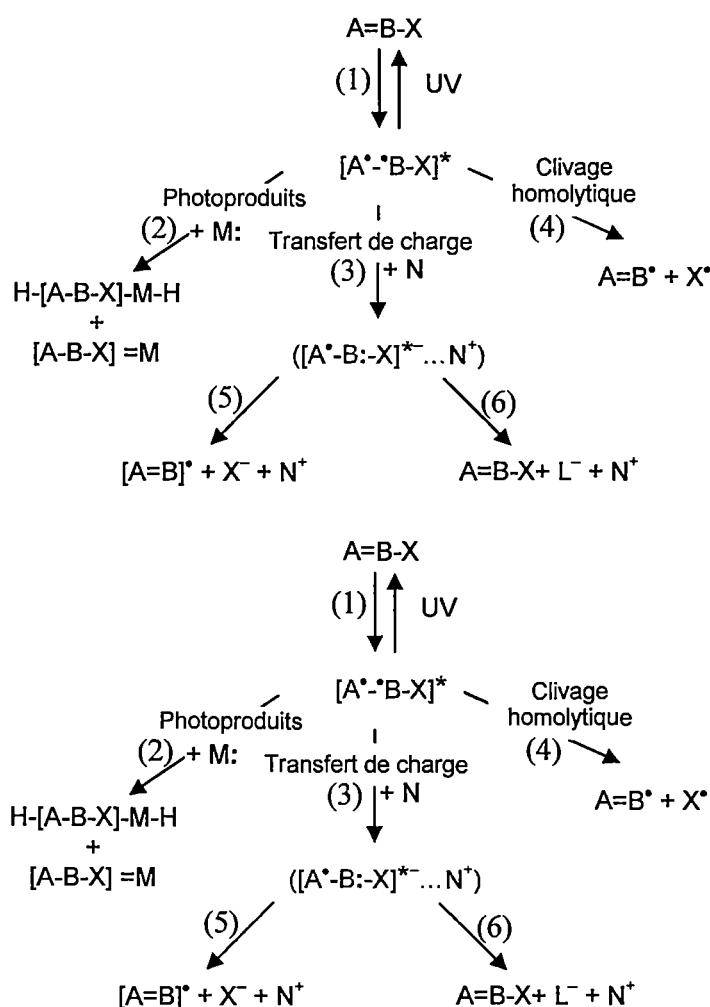
cassures sur le BrdUrd incorporé dans un ADN parfaitement hybridé. Ces résultats s'expliquent par l'impossibilité de stabiliser l'excès d'électron sur cette base bromée et dans ces conditions. Pourtant, les expériences obtenues en photolyse semblent contredire ces interprétations. En effet, en photolyse, les cassures du brin bromé sont favorisées dans un double brin d'ADN parfait, comparativement à un ADN double brin semi-complémentaire. La différence majeure lors de la photolyse, vient du fait que l'électron arrive sur une base déjà excitée. La base bromée (BrU), et particulièrement la liaison C-Br, sont déjà déstabilisées par l'absorption d'un photon (figure V.6, réaction 1) : une déformation et à une polarisation de la molécule en résulte (figure V.5).



**Figure V.6 :** Photosensibilisation et polarisation du BrdUrd ( $\uparrow$ ) suivi par le départ de l'anion  $\text{Br}^-$

Cette polarisation va diminuer la barrière de potentiels entre l'adénine et le BrdUrd excité, permettant l'arrachement d'un électron sur l'adénine voisine (réaction 3). Il a déjà été prouvé que le BrdUrd excité pouvait, en passant par un état triplet, faire un transfert d'électron entre des molécules rapprochées comme dans une solution de 2-propanol ou de tryptophane, et arracher un électron (Ito et al., 1980; Barry et al., 1981). Cet excès d'électrons sur cette base excitée va ainsi favoriser le départ de

l'atome de brome (réaction 5), qui est également possible mais de manière plus discrète par clivage homolytique (réaction 4). Il y a ainsi départ d'un anion  $\text{Br}^-$  et formation du radical uridinyle dans l'ADN double brin. Ce radical, pour se stabiliser, va arracher un hydrogène en C1' ou C2' d'un sucre proche et produire ainsi une coupure de brin ou des sites abasiques.



**Figure V.7 :** Schéma de photolyse d'un produit bromé ( $\text{X} = \text{Br}$ )

En photolyse, il y a très peu de cassures de brin dans un ADN bromé simple brin ou semi-complémentaire. Ce phénomène peut s'expliquer de deux façons. Premièrement, le transfert d'électrons favorisant la cassure de la liaison C-Br peut être perturbé par cette structure. En effet, les mésappariements de bases peuvent perturber la migration d'une charge le long de l'ADN (Giese, 2001; Okada et al., 2003) et ainsi défavoriser la cassure de la liaison C-Br. Deuxièmement, cette structure d'ADN plus relâchée, amène une compétition entre l'arrachement d'un hydrogène sur le sucre du brin qui porte le BrdUrd, amenant à la cassure de brin, ou l'attaque du brin mésapparié opposé et la formation de ponts interbrins. Les différentes expériences réalisées par photolyse d'un ADN bromé semi-complémentaire nous ont permis d'observer l'influence de la structure de l'ADN sur la quantité et le type de dommages produits. Le BrdUrd peut en effet engendrer différents types de dommages tels que les cassures de brin ou des dimères intra- et interbrins. Avec une structure semi-complémentaire, il est donc possible d'avoir des cassures sur le brin portant le BrdUrd mais également sur le brin opposé non bromé par transfert du radical. Il y a également formation d'un autre dommage, les dimères interbrins. En photolyse, ces dimères peuvent avoir deux origines : soit l'attaque directe du radical uridinyle sur des bases du brin opposé, soit la formation de photoproduits (figure V.6, réaction 2) entre les thymines des deux brins opposés. Afin de favoriser la formation des dimères interbrins, il faut permettre un rapprochement des deux brins. La zone mésappariée est donc indispensable, car elle permet une structure de l'ADN en « fermeture éclair ».

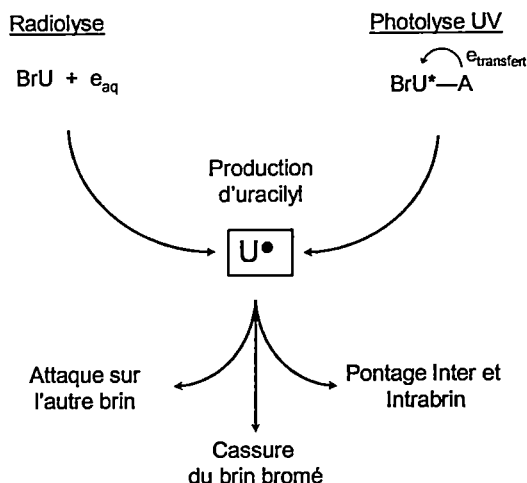


### **V.5 Quelle est cette nouvelle structure de l'ADN en « fermeture éclair »?**

La formation, à l'UV et avec un rayonnement gamma, des deux types de dimères interbrins a été observée exclusivement avec un ADN bromé contenant 5 bases mésappariées autour du BrdUrd. Nous avons émis l'hypothèse que la formation de ce type de dommage devait impliquer la proximité des deux brins opposés. Plusieurs études ont permis de constater que le mésappariement de plusieurs bases consécutives pouvait amener à la formation d'une structure particulière de l'ADN. Ainsi, les bases mésappariées des deux brins peuvent s'intercaler les unes dans les autres : c'est ce que l'on appelle un effet de « fermeture éclair ». Dans les articles 2 et 3, il est mentionné que la formation de cette structure de d'ADN en « fermeture éclair » peut favoriser l'enchevêtrement des bases des deux brins opposés et ainsi favoriser la production de dimères interbrins. Cette structure est-elle observable dans une cellule? Certaines données en photolyse nous permettent de croire qu'il est possible de trouver dans la cellule des zones très relâchées permettant l'enchevêtrement des bases. En effet, nous avons observé ainsi que d'autres équipes (Nejedly et al., 2001), la formation de dimères interbrins lors de la photolyse d'oligonucléotides double brins parfaitement hybridés, mais dont une zone de 5 bases au centre était formée d'une suite d'adénines. Cette suite d'adénine provoque la formation de zone beaucoup plus relâchée et ainsi permet la respiration et possiblement, l'enchevêtrement des deux brins opposés. Les rendements de formation de ce dimères restent toutefois très inférieurs qu'avec un ADN semi-complémentaire.

## V.6 Quels sont les évènements amenant à la cassure de brin par le BrdUrd?

La chronologie des cassures radio-induites à l'intérieur d'un ADN bromé laisse certaines questions en suspens. Lorsque l'ADN est en parfait double brin, la non réactivité du BrdUrd peut s'expliquer de deux façons : soit le radical uridinyle formé, par le départ de l'anion  $\text{Br}^-$ , est moins mobile et donc moins susceptible d'arracher un hydrogène sur un sucre voisin, soit la formation des radicaux uridinyles est diminuée par un transfert de l'excès d'électrons au milieu ou aux autres bases. Un ADN bromé parfaitement double brin et irradié à 700Gy ne présente aucune augmentation de cassures après traitement avec une uracile-glycosylase. Cette observation appuie, de façon indirecte, qu'il n'y a pas ou peu de formation d'uracile dans l'ADN causée par départ de l'atome de brome. Aussi, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'atténuation de la réactivité du BrdUrd est majoritairement due à une diminution de la rupture du lien C-Br, et non à un piégeage du radical uridinyle dans la double hélice l'empêchant ainsi d'attaquer les sucres proches. D'autres expériences réalisées avec un rayonnement UV viennent supporter cette hypothèse. En effet, lors de la photolyse d'un ADN bromé parfaitement double brin, la formation du radical uridinyle en double brin implique la production de cassures de brin. Cette observation, faite en photolyse, appuie les expériences de radiolyse dans lesquelles nous avons supposé qu'il n'y avait pas ou peu de cassures de brin dans un ADN bromé parfaitement double brin car il n'y avait pas ou peu de formation du radical uracilyle. Il est donc clair que la formation de ce radical est l'élément central de la photo et/ou radiosensibilisation de l'ADN (figure V.7).



**Figure V.8:** Radical uracilyl élément central dans la photo et radio-sensibilisation

#### V-7 Comment les électrons secondaires devraient interagir avec le BrdUrd dans un ADN?

Les électrons secondaires vont-ils réagir comme les électrons aqueux ou comme les électrons photo-induits? La différence de réactivité, déjà observée, entre ces deux types d'électrons est essentiellement due au fait que l'électron photo-induit interagit avec une base déjà excitée. Ceci modifie la stabilité du lien C-Br et ainsi permet la rupture de ce lien et la formation du radical déoxyurydinyne même en double brin.

Dans le cas des électrons secondaires, certaines études ont montré qu'il y avait excitation de la molécule lors de l'attachement dissociatif de cet électron et la molécule cible tel que le 5-bromouracil et la thymine (Abouaf et al., 2003; Lévesque et al., soumis 2005). L'électron secondaire est ainsi capable de déposer une partie de

son énergie et exciter le BrdUrd. Il faut toutefois que l'énergie de l'électron de basse énergie soit assez élevée, supérieur à 5eV, pour déposer assez d'énergie soit ainsi suffisamment perturber la liaison C-Br. Dans ce cas, la réactivité de cet électron secondaire devrait être semblable aux électrons photo-induits et ainsi induire la rupture du lien C-Br dans un ADN double brin parfait. L'électron secondaire, n'étant pas dépendant de la structure de l'ADN, devrait conduire également au départ de l'atome de brome. En dessous de 5eV l'électron de basse énergie réagira plutôt comme un électron aqueux et perturbera le nuage électronique uniquement sans excité la molécule.

Selon notre hypothèse, la réactivité de ces électrons secondaires de plus de 5eV devrait donc être un intermédiaire entre la réactivité des électrons aqueux et celle des électrons photo-induits. Ils devraient ainsi induire des cassures de brin en un ADN semi-complémentaire comme les électrons aqueux mais également produire des cassures dans un ADN parfaitement complémentaire comme les électrons photo-induits. Toutefois, la production du dimère interbrin devrait se limiter aux zones simples brins de l'ADN.

#### **V.8 Distribution du dépôt d'énergie d'un rayonnement gamma pouvant amener aux dommages à l'ADN bromé?**

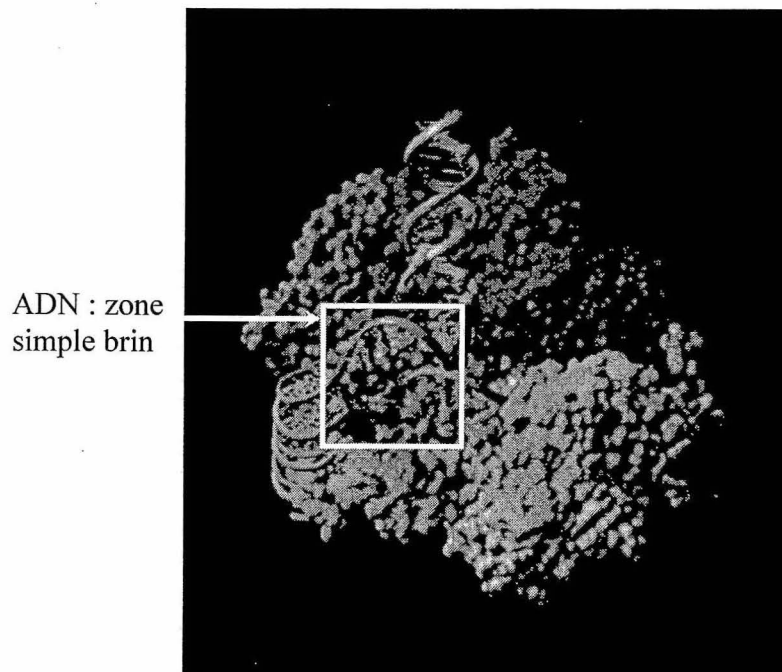
Lors du passage d'un rayonnement gamma dans une cellule plusieurs les dépôts d'énergie peut se faire soit proche de la molécule cible soit sur la molécule cible. Lors de l'irradiation de cellules on admet que plus de 50% du dépôt de l'énergie amenant à des dommages se font proche de l'ADN. Ce sont les radicaux produits

dans le milieu qui peuvent diffuser et interagir avec l'ADN et ainsi engendrer des dommages : c'est l'effet indirect. Nous avons montré que ce sont essentiellement les électrons aqueux qui vont spécifiquement interagir avec le BrdUrd et amener une radiosensibilisation de l'ADN. Le reste du dépôt d'énergie va se faire directement sur l'ADN ou sur l'eau dite de structure (2,5 à 6 molécules d'eau par groupement phosphate). Dépendamment de l'énergie du photon le type d'interaction sera différent. Pour des photons gamma de 1MeV (source de cobalt 60) l'interaction avec la matière se fait par interaction compton. Cette interaction va amener à la production d'électron de haute énergie qui à leur tour vont ioniser le milieu ou la molécule cible et produire des électrons de faible énergie capable de produire de nombreux dommages à l'ADN. Toutefois, tout au long de la trajectoire le photon va créer des électrons très énergétiques et perdre de l'énergie. En fin de parcours entre 20 et 40 cm de profondeur l'énergie de photon est assez basse pour faire des interactions photoélectriques. Dans le dernier cas, si ce photon interagit avec un atome de brome, il s'en suit une cascade Auger avec émission de proche 6 électrons d'énergies comprises entre 100 à 1000eV et production d'un ion multichargé. Cette dernière possibilité d'interaction reste faible mais lorsqu'elle se produit, il y a production de cassure double que l'ADN soit en double brin complémentaire ou en semi-complémentaire.

### **V.9 Existe-t-il des zones simple brin dans la cellule?**

Une condition indispensable pour la radiosensibilisation de l'ADN par le BrdUrd est la présence d'une zone simple brin. En effet, que ce soit avec une irradiation gamma ou UV, la structure de l'ADN a une importance primordiale sur le

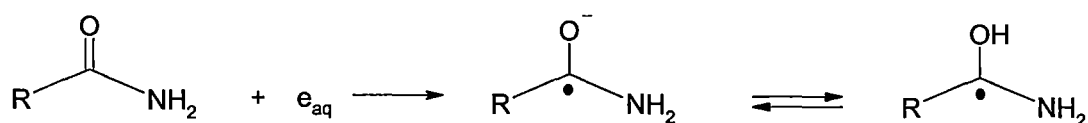
caractère radiosensibilisant du BrdUrd et la formation de dimères interbrins. Dans la cellule, ce type de structure est observable dans de nombreuses situations. Dans des conditions physiologiques, un ADN très relâché représentant notre bulle, peut être observé dans des fourches de réplication ou des bulles de transcription (figure V.9). Dans certaines zones riches en AT, telles que les zones promotrices des gènes, l'ADN a naturellement tendance à respirer. Dans d'autres conditions, telles que les erreurs de réplication ou de réparation produisant des bases mésappariées, des sites abasiques ou des délétions et insertions de bases, l'ADN devient plus relâché. Ces zones sont ainsi potentiellement « radiosensibilisable » par la présence d'un BrdUrd.



**Figure V.9 :** Ouverture de l'ADN au cours de la transcription d'un gène par la T7 polymérase

### V.10 Quelle est l'influence du milieu?

Le milieu va jouer un rôle important dans le caractère radiosensibilisant du BrdUrd, essentiellement en affectant, premièrement, la disponibilité des électrons aqueux à interagir avec le BrdUrd et, deuxièmement, interagissant directement sur la structure dynamique de l'ADN. Dans le cas de l'effet indirect des électrons aqueux, la présence de capteurs d'électrons dans le milieu, tel que l'oxygène, réduit considérablement les cassures spécifiques dues à la présence du BrdUrd. Au cours de nos expériences, nous avons pu observer une diminution dramatique des cassures au site du BrdUrd en fonction de la présence d'oxygène dans le milieu. Cependant, dans la cellule, de nombreux capteurs autres que l'oxygène dissous peuvent diminuer la disponibilité des électrons aqueux. À proximité de l'ADN de nombreuses protéines histones et non histones peuvent interagir avec ces électrons et diminuer ainsi leur contribution aux dommages à l'ADN. La vitesse de réaction entre les électrons et un acide aminé va dépendre de plusieurs facteurs : la possible stabilisation de l'anion par délocalisation de la charge, la charge elle-même du composé cible et la taille du peptide. De plus, cette vitesse (de l'ordre de  $10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) est comparable aux vitesses de réaction avec l'ADN (von Sonntag, 1983).

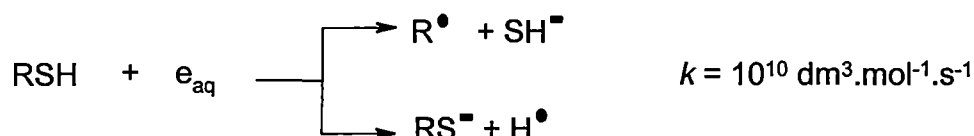


**Figure V.10 :** interaction d'un électron aqueux avec une liaison peptidique

**Tableau V.3 :** Exemple de constantes de vitesse de réaction entre un électron aqueux et des glycines modifiées ( $k(e_{aq})$  [ $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ])

n	Ac-(Gly) <sub>n</sub> -COO <sup>-</sup>	<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-(Gly) <sub>n</sub> -COO <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> N-(Gly) <sub>n</sub> -COOMe	<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-(Gly) <sub>n</sub> -COOMe
1	$2,6 \times 10^6$	$8,2 \times 10^6$	$3,3 \times 10^8$	$6,8 \times 10^9$
2	$6,4 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$
3		$1,8 \times 10^9$		

De plus, l'électron possède également la capacité de migrer le long d'un peptide et d'endommager certaines régions spécifiques. Il peut, par exemple induire une désamination en N-terminal de la protéine (Inanami et al., 1986), attaquer les résidus aromatiques (Srinivasan et Van de Vorst, 1971) tel que le noyau indole du tryptophane (Abdoul-Carime et al., 2004) ou interagir avec les groupements thiolés (Abdoul-Carime et al., 2002) des acides aminés. Ces derniers groupements sont de très bons pièges pour les électrons avec des constantes de réaction près de celle de la diffusion de l'électron (von Sonntag, 1983).



**Figure V.11 :** interaction d'un électron aqueux avec un groupement thiolé

L'attachement de ces électrons sur les protéines peut produire un radical réactif sur la protéine par dégradation des résidus aromatiques ou par fragmentation. Le radical formé attaque à son tour d'autres sites sur la protéine ou des composés voisins tel que l'ADN. Ce phénomène conduit au transfert du dommage par arrachement d'un hydrogène ou la formation de ponts entre deux molécules telles que des dimères ADN-



protéine (Hawkins et al., 2002) ou protéine-protéine (Kadlcik et al., 2004). Dans certain cas, si le peptide est en contact étroit avec l'ADN, l'électron se propage à l'ADN par transfert de charge (Wagenknecht et al., 2000) : le dommage se déplace ainsi sur une base de l'ADN.

L'effet indirect est donc très dépendant du milieu. Dans les cellules, une forte compétition va exister entre attaque de l'ADN et du BrdUrd par un électron aqueux ou le piégeage de celui-ci par l'oxygène et les protéines voisines.

Les protéines agissent également sur la respiration de l'ADN, un autre facteur important lors de la radiosensibilisation de celui-ci par le BrdUrd. Elles sont capables de créer des zones simples brins telles que nous avons discutés précédemment mais également de jouer sur l'état de condensation de l'ADN (Eberhardter et Becker, 2002). Ces protéines, appelés histones, sont composées de plusieurs lysines portant une charge positive. La cellule se sert de la présence ou non de cette charge positive pour modifier l'affinité entre ces protéines et l'ADN par acétylation du groupement amine terminal du résidu de la lysine. L'acétylation, masquant la charge positive, va diminuer cette affinité et permettre à l'ADN d'être plus relâché. Les deux brins de l'ADN vont ainsi pouvoir se déshybrider par agitation thermique uniquement ou à l'aide de protéines telles que les récepteurs nucléaires (Kraus et Wong, 2002) et les enzymes de transcription (Stern D.E. et Berger, 2000; Zhang et Reinberg, 2001) créant des zones simples brins radiosensibles. Il a déjà été montré que les histones (Elia et Bradley, 1992; Xue et al., 1994; Oleinick et al., 2004) ou d'autres molécules, ayant une forte affinité pour l'ADN, telles que les oligolysines (Newton et al., 2004) ou les spermines (Chiu et Oleinick, 1997) radioprotège celui-ci. L'efficacité de cette

radioprotection est généralement attribuée à l'atténuation des radicaux libres disponibles dans le milieu. Toutefois, il est imaginable de penser que l'efficacité de radiosensibilisation de l'ADN par le BrdUrd que ce soit par un effet direct ou indirect, devrait fortement être affectée d'une part par la proportion d'électrons captés dans le milieu par les protéines ou l'oxygène et d'autre part par l'état de condensation de l'ADN imposé par les protéines empêchant ainsi la formation de zones plus relâchées et donc plus radiosensibles.

#### **V.11 Est-ce l'effet direct ou indirect qui prédomine lors du dommage au BrdUrd dans les cellules?**

Quelle est l'importance des effets direct et indirect dans la radiosensibilisation des cellules par le BrdUrd? Il semble que les deux effets, direct et indirect, représentés respectivement par les électrons secondaires et les électrons aqueux lors d'irradiation gamma, soient importants dans la dégradation de la base BrU. La substitution du groupement méthyle par un atome de brome augmente le rendement radiolytique de dégradation du BrU par les électrons aqueux et augmente également la section efficace de cette base halogénée face aux électrons secondaires. Quel est donc le rôle de chaque effet dans la cellule?

Les expériences d'irradiation sur des cellules en culture ayant incorporées le BrdUrd ont mis en valeur la grande capacité du BrdUrd a radiosensibiliser les cellules. Ces expériences ont été réalisées en conditions aérées, montrant à première vue que la présence d'oxygène ne semble pas éliminer complètement l'effet du BrdUrd. Deux hypothèses peuvent être émises : soit l'effet direct des électrons secondaires sur le

BrdUrd est le principal responsable de l'augmentation de la radiosensibilité de ces cellules bromées, soit que les conditions d'oxygénation ne sont pas homogènes dans les cellules en pétris. Si l'on considère que l'effet direct est responsable de façon prépondérante du phénomène de radiosensibilisation des cellules par le BrdUrd, l'oxygène ne devrait pas modifier les rendements de dégradation du BrdUrd incorporé dans l'ADN génomique et ainsi ne devrait pas influencer la radiosensibilité de ces cellules. Nous testons actuellement cette hypothèse. Des expériences sur l'irradiation des cellules en culture dans un milieu avec ou sans oxygène et en présence ou non de BrdUrd sont en cours. Les résultats de ces expériences vont ainsi nous éclairer sur l'effet prépondérant direct ou indirect lors de l'irradiation de cellules « bromées ». La seconde hypothèse, sur l'homogénéité de l'oxygénation des cellules semble peu crédible dans le cas de cellules en pétris. Toutefois elle pourrait être une explication dans le cas des cellules dans une tumeur.

#### **V.12 Peut-on apporter de nouveaux arguments sur l'échec clinique de la radiosensibilisation des tumeurs par le BrdUrd?**

Il est important de savoir que l'oxygénation des cellules dans une tumeur (Jain, 2005) est très hétérogène et différente de celle des cellules en culture. Les tumeurs solides se divisent généralement en trois régions (Helmlinger et al., 1997). Une première région à la surface de la tumeur où les cellules sont très prolifératives. Une seconde région où plus on se rapproche du centre de la tumeur plus les cellules se retrouvent rapidement dans un état dit quiescent, à cause du manque d'oxygène.

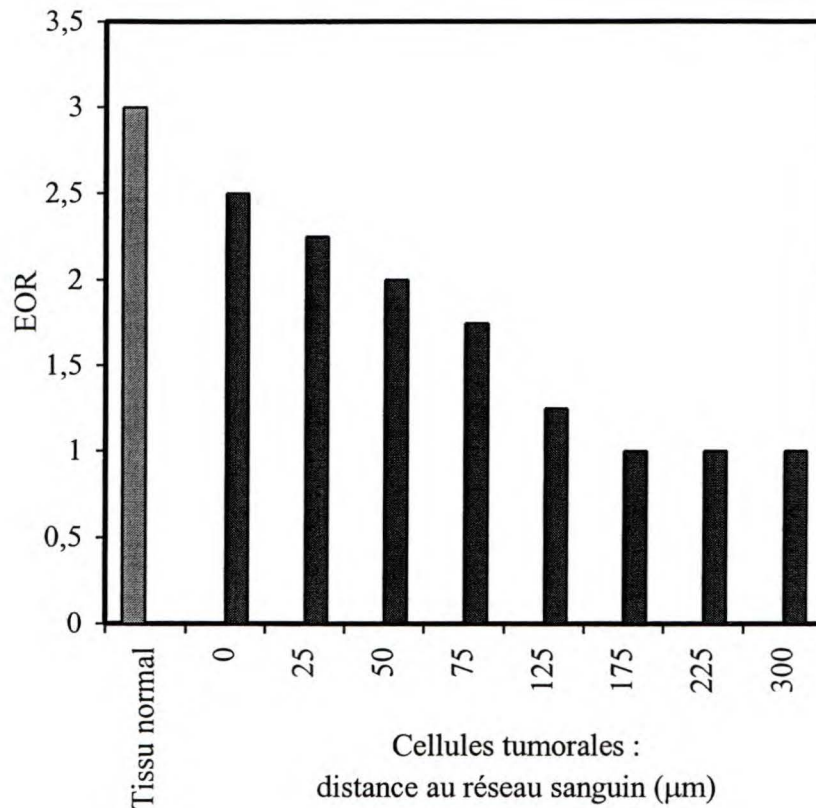
Finalement, une troisième région au centre de la tumeur, où les cellules se trouvent dans un état de nécrose.

**Tableau V.4 :** Pression d'oxygène ( $pO_2$ , mm Hg) et pH en fonction de la distance (D en  $\mu m$ ) des vaisseaux sanguins (Perez et al., 2004)

	Tissu Normal	Cellules tumorales							
		Prolifératives		Quiescentes			Nécrotique		
D ( $\mu m$ )	/	0	25	50	75	125	175	225	300
$pO_2$	30	15	10	7,5	5	2,5	~ 0	~ 0	~ 0
pH	7,3	7,3	7,2	7,0	7,0	7,0	6,9	6,8	6,7

À aussi peu que 75  $\mu m$  de la surface de la tumeur, la pression en oxygène passe de 14 mm Hg à 5 mm Hg. Dans des conditions hypoxiques, *in vitro* (Durand, 1975; Sheldon et Fowler, 1979) ou *in vivo* (Medini et al., 1980; Haffty et al., 2000) les cellules deviennent beaucoup plus résistantes au rayonnement gamma. La mortalité cellulaire est effectivement beaucoup plus élevée dans des cellules oxygénées que dans des cellules non oxygénées. On définit un rapport d'accroissement de la mortalité dû à l'oxygène, le EOR (Alper et Forage, 1970), qui peut passer de 1 à 3, dépendamment de l'oxygénation des cellules. Dans le cas d'une tumeur, il est donc possible d'estimer le EOR des cellules en fonction de leur distance à la surface. Selon la profondeur dans la tumeur, le EOR devrait donc passer d'un facteur 2,5 à 1. Les cellules au centre de la tumeur vont donc être radioprotégées par ce manque d'oxygène (figure V.11). Ainsi, l'effet des rayonnements gamma, particulièrement l'effet indirect, va être atténué par ce manque d'oxygène (Watson et Gillies, 1970).

Les cellules dans cet état quiescent vont aussi subir une forte diminution de leur activité de transcription et de réplication.



**Figure V.12:** EOR en fonction de la profondeur des cellules dans la tumeur

Dans cet état, l'ADN respire beaucoup moins et le BrdUrd risque de se retrouver dans un ADN double brin plus compact. Lorsque l'ADN est dans cet état, le BrdUrd ne possède aucune action radiosensibilisante. Aussi, la diminution de la concentration en oxygène dans les cellules tumorales profondes (75 μm d'un vaisseau sanguin) va causer une diminution de l'activité métabolique, mais également engendrer une résistance aux rayonnements ionisants par inactivation du caractère radiosensibilisant du BrdUrd. Ces phénomènes pourraient expliquer l'échec clinique de la radiosensibilisation des tumeurs solides par le BrdUrd. Avant d'émettre d'autres

hypothèses, des études devraient être menées afin d'interpréter nos résultats dans des conditions biologiques : la mesure des dommages dans un ADN génomique et des aberrations chromosomiques dans des cellules tumorales en présence ou non de BrdUrd ainsi que l'importance de l'effet direct sur la radiosensibilisation par le BrdUrd.

## VI Conclusion

Selon les différentes études déjà réalisées sur le BrdUrd et nos récentes recherches, il est possible d'affirmer que **le BrdUrd est un bon radiosensibilisateur**. Nous avons démontré, au cours de nos expériences, que le BrdUrd augmente significativement les dommages dans l'ADN. Cette base pyrimidine halogénée accroît, non seulement le nombre de cassures sur le brin qui la porte, mais également sur le brin opposé. Toutefois, nous avons identifié certaines limitations à son action. Le BrdUrd doit avoir besoin d'un certain « degré de liberté » pour radiosensibiliser l'ADN. En effet, nos résultats ont démontré que le BrdUrd radiosensibilise moins efficacement les zones compactes que les zones plus relâchées de l'ADN tels que les mésappariements de base. Ces zones, dites relâchées, représentent toutes les perturbations possibles de l'hybridation des deux brins de l'ADN. Dans les cellules, il est possible d'identifier plusieurs de ces zones, tels que les bulles de transcription, les fourches de réplication, les mauvais appariements de bases, voire même les sites abasiques. Mais une question demeure très importante : quel est le rôle des électrons aqueux dans les dommages à l'ADN cellulaires. Plusieurs sont captés par le milieu, mais néanmoins, une certaine quantité interagira avec l'ADN. Un autre type d'électron est également présent dans la cellule et en solution : ce sont les électrons dits secondaires. Produits également en grande quantité, leur rôle est négligeable en solution, mais devient beaucoup plus important dans la cellule où l'ADN est très concentré. Quelles sont leurs actions et leurs efficacités à endommager un ADN bromé?

De nombreuses recherches restent à faire, telle que la caractérisation par spectrométrie de masse du dimère interbrin radio- et photo-induit. Nous essayons également de reconstruire *in vitro*, une bulle de transcription. Ceci nous permettra ainsi d'identifier des dommages spécifiquement dus à la présence de BrdUrd dans une zone plus relâchée, tels que les dimères interbrins. À l'aide de cette information, nous allons pouvoir rechercher spécifiquement dans la cellule ce type de dommage, véritable signature des zones ouvertes de l'ADN. Une autre voie de recherche serait de cibler certaines zones de l'ADN génomique avec un vecteur bromé. Ce vecteur bromé pourrait ainsi former une zone simple brin avec certaines séquences répétitives de l'ADN tels les régions promotrices des gènes, les séquences ALU ou les mini satellites et ainsi les radio- ou photo-sensibiliser.

Les zones simples brins de l'ADN semblent être des zones très sensibles, donc un choix particulier pour le ciblage avec des radiosensibilisateurs. Les réactions chimiques se produisant dans ces zones semblent être plus importantes que dans le reste de l'ADN. Est-ce le site privilégié pour l'intégration de certains virus? Est-ce un lieu privilégié pour le dommage aux bases?

*Ces zones sont, en effet, de véritables talons d'Achille pour l'ADN que la cellule doit impérativement protéger!*



## Références:

- |   |    |
|---|----|
| Abdoul-Carime H, Dugal PC, Sanche L (2000) Damage induced by 1-30 eV electrons on thymine- and bromouracil-substituted oligonucleotides. <i>Radiat Res.</i> , 153, 23-8.  | 1  |
| Abdoul-Carime H, Cecchini S, Sanche L (2002) Alteration of protein structure induced by low-energy (<18 eV) electrons. I. The peptide and disulfide bridges. <i>Radiat Res.</i> , 158, 23-31.                       | 2  |
| Abdoul-Carime H, Gohlke S, Illenberger E (2004) Degradation of N-acetyl tryptophan by low-energy (<12 eV) electrons. <i>J Am Chem Soc.</i> , 126, 12158-61.   | 3  |
| Abdoul-Carime H, Huels MA, Illenberger E and Sanche L (2001) Sensitizing DNA to secondary electron damage: resonant formation of oxidative radicals from 5-halouracils. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 123, 5354-5355     | 4  |
| Abdoul-Carime H, Sanche L (2002) Fragmentation of short single DNA strands by 1-30 eV electrons: dependence on base identity and sequence. <i>Int J Radiat Biol.</i> , 78, 89-99.                                   | 5  |
| Abouaf R, Pommier J, Dunet H (2003) Electronic and vibrational excitation in gas phase thymine and 5-bromouracil by electron impact <i>Chem. Phys .Let.</i> , 381, 486-494  | 6  |
| Adams GE, Willson RL (1972) On the mechanism of BUdR sensitization: a pulse radiolysis study of one electron transfer in nucleic-acid derivatives. <i>Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.</i> , 22, 589-97. | 7  |
| Alper T, Forage AJ, (1970) An increase in oxygen enhancement ratio with increase in LET. <i>Br J Radiol.</i> 43, 153  | 8  |
| Asquith B, Debaq C, Macallan DC, Willems L, Bangham CR (2002) Lymphocyte kinetics: the interpretation of labelling data. <i>Trends Immunol.</i> , 23(12):596-601  | 9  |
| Barry J, Swanson J, Christopher Kutzer, Tad H. Koch (1981) Photoreduction of 5-bromouracil. Ionic and free-radical pathways. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 103(5); 1274-1276.  | 10 |
| Beach C, Fuciarelli AF, Zimbrick JD. (1994) Electron migration along 5-bromouracil-substituted DNA irradiated in solution and in cells. <i>Radiat Res.</i> 137, 385-93.   | 11 |
| Bergeron F, Houde D, Hunting DJ, Wagner JR (2004) Electron transfer in DNA  | 12 |

- pduplexes containing 2-methyl-1,4-naphthoquinone.
- Nucleic Acids Res.*
- , 32, 6154-263.
- Berry SE, Garces C, Hwang HS, Kunugi K, Meyers M, Davis TW, Boothman DA, Kinsella TJ. (1999) The mismatch repair protein, hMLH1, mediates 5-substituted halogenated thymidine analogue cytotoxicity, DNA incorporation, and radiosensitization in human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 59, 1840-5. 13
- Berry SE, Kinsella TJ. (2001) Targeting DNA mismatch repair for radiosensitization. *Semin Radiat Oncol.*, 11, 300-15. 14
- Besaratinia A, Synold TW, Xi B, Pfeifer GP (2004) G-to-T transversions and small tandem base deletions are the hallmark of mutations induced by ultraviolet a radiation in mammalian cells. *Biochemistry.*, 43(25):8169-77. 15
- Bishayee A, Rao DV, Howell RW (2000) Radiation protection by cysteamine against the lethal effects of intracellularly localized Auger electron, alpha- and beta-particle emitting radionuclides, *Acta Oncol.*, 39(6):713-20. 16
- Boudaiffa B, Cloutier P, Hunting D, Huels MA, Sanche L (2000) Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons. *Science*, 287(5458):1658-60. 17
- Breen AP, Murphy JA (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.*, 18(6):1033-77. 18
- Bühler RE (1973) Radiation chemistry of the carbon-halogen bond. The Chemistry of the carbon-halogen bond (S. Patai, Ed.), part 2, 795-864. Wiley, Chichester. 19
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res.*, 424(1-2):9-21. 20
- Cai, ZL, Li XF, Sevilla MD (2002) Excess electron transfer in DNA: Effect of base sequence and proton transfer, *J Phys Chem. B*, 106, 2755-2762 21
- Chiu S, Oleinick NL (1997) Radioprotection against the formation of DNA double-strand breaks in cellular DNA but not native cellular chromatin by the polyamine spermine. *Radiat Res.*, 148, 188-92. 22
- Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP (2001) The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci.*, 928:327-35. 23
- Condorelli G, De Guidi G, Giuffrida S, Sortino S, Chillemi R, Sciuto S (1999) Molecular mechanisms of photosensitization induced by drugs. XII. Photochemistry 24

- p and photosensitization of rifloxacin: an unusual photodegradation path for the
- 
- antibacterials containing a fluoroquinolone-like chromophore.
- Photochem  
Photobiol.*
- , 70(3):280-6.
- Coohill, T. P., Peak, M. J. & Peak, J. G. (1987) The effects of the ultraviolet 25  
wavelengths of radiation present in sunlight on human cells in vitro. *Photochem.  
Photobiol.* 46, 1043-1050
- Cook GP, Greenberg MM (1996) A Novel Mechanism for the Formation of Direct 26  
Strand Breaks upon Anaerobic Photolysis of Duplex DNA Containing 5-  
Bromodeoxyuridine. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(42); 10025-10030
- Cooper GM, Greer S (1970) Irreversible inhibition of dehalogenation of 5-iodouracil 27  
by 5-diazouracil and reversible inhibition by 5-cyanouracil. *Cancer Res.*, 30(12),  
2937-41.
- Dewey WC, Sedita BA, Humphrey RM. (1966) Radiosensitization of X 28  
chromosome of Chinese hamster cells related to incorporation of 5-  
bromodeoxyuridine. *Science*, 152, 519-21.
- Doiron A, Yapp DT, Olivares M, Zhu JX, Lehnert S (1999) Tumor 29  
radiosensitization by sustained intratumoral release of bromodeoxyuridine. *Cancer  
Res.*, 59(15), 3677-81.
- Douki T, Cadet J (1999) Modification of DNA bases by photosensitized one- 30  
electron oxidation. *Int J Radiat Biol.*, 75(5), 571-81.
- Douki T, Laporte G, Cadet J (2003) Inter-strand photoproducts are produced in high 31  
yield within A-DNA exposed to UVC radiation. *Nucleic Acids Res.*, 31(12), 3134-  
42.
- Douki T, Ravanat JL, Frelon S, Bourdat AG, Pouget JP, Cadet J (2003) HPLC- 32  
MS/MS measurement of oxidative base damage to isolated and cellular DNA, in:  
R.G. Cutler, H. Rodriguez (Eds.), *Oxidative Stress and Aging: Advances in Basic  
Science, Diagnostics, and Intervention*, World Scientific, New Jersey-London-  
Singapore-Hong Kong., 190-202.
- Durand RE (1975) Cure, regression and cell survival: a comparison of common 33  
radiobiological endpoints using an in vitro tumour model. *Br J Radiol.*, 48, 556-71.
- Eberharther A and Becker PB (2002) Histone acetylation: a switch between 34  
repressive and permissive chromatin, *EMBO Reports*, 3, 224-229
- Eisbruch A, Robertson JM, Johnston CM, Tworek J, Reynolds KR, Roberts JA, 35  
Lawrence TS (1999) Bromodeoxyuridine alternating with radiation for advanced

- uterine cervix cancer: a phase I and drug incorporation study. *J Clin Oncol.*, 17(1):31-40.
- Elia MC, Bradley MO (1992) Influence of chromatin structure on the induction of DNA double strand breaks by ionizing radiation. *Cancer Res.*, 52, 1580-6. 36
- Epstein AH, Lebovics RS, Van Waes C, Smith J, Okunieff P, Cook JA (1998) Intravenous delivery of 5'-iododeoxyuridine during hyperfractionated radiotherapy for locally advanced head and neck cancers: results of a pilot study. *Laryngoscope*, 108(7):1090-4. 37
- Epstein JH (1978) Photocarcinogenesis: a review. *Natl Cancer Inst Monogr.*, 50, 13-25. 38
- Foote CS (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science*, 162(857):963-70. 39
- Fuciarelli AF, Sisk EC, Miller JH, Zimbrick JD (1994) Radiation-induced electron migration in nucleic acids. *Int J Radiat Biol.*, 66, 505-9. 40
- Fuciarelli AF, Sisk EC, Zimbrick JD (1994) Electron migration in oligonucleotides upon gamma-irradiation in solution. *Int J Radiat Biol.* 65, 409-18. 41
- Gange RW (1988) Comparison of pigment responses in human skin to UVB and UVA radiation. *Prog Clin Biol Res.*, 256, 475-85. 42
- Gantchev TG, Cecchini S, Hunting DJ (2005) Dynamic Conformational States of DNA Containing T·T or T·BrdU Mismatched Bases : Wobble H - Bond Pairing vs. Cross-Strand Inter-Atomic Contacts. *Journal of Molecular Modeling J Mol Model.*, 11(2),141-59. 43
- Giese B (2001) Long-distance electron transfer through DNA. *Annu Rev Biochem.*, 71, 51-70. 44
- Gilbert E, Volkert O, Schulte-Frohlinde D (1967) Radiochemistry of aqueous, oxygen-containing solutions of 5-bromouracil (I). Identification of the radiolysis products. *Z. Naturforsch. B*, 22, 477-480. 45
- Greenstock CL, Whitehouse RP (1992) Radiation chemical studies of sensitization by 5-bromouridine-5'-monophosphate (5-BrUMP). *Radiat. Environ. Biophys.*, 31, 1-9. 46

- Groves MD, Maor MH, Meyers C, Kyritsis AP, Jaeckle KA, Yung WK, Sawaya RE, Hess K, Bruner JM, Peterson P, Levin VA (1999) A phase II trial of high-dose bromodeoxyuridine with accelerated fractionation radiotherapy followed by procarbazine, lomustine, and vincristine for glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 45(1), 127-35. 47
- Gupta RC, Lutz WK (1999) Background DNA damage for endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence? *Mutat Res.*, 424(1-2),1-8. 48
- Haffty BG, Hurley R, Peters LJ (1999) Radiation therapy with hyperbaric oxygen at 4 atmospheres pressure in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck: results of a randomized clinical trial. *Cancer J Sci Am.*, 5, 341-7. 49
- Hagan MP, Dodgen DP, Beer JZ (1988) Impaired repair of UVC-induced DNA damage in L5178Y-R cells: sedimentation studies with the use of 5'-bromodeoxyuridine photolysis. *Photochem. Photobiology*, 47(6), 815-21 50
- Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z (2000) Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis *Exp Cell Res.*, 260(2), 248-56. 51
- Hall, Eric J., (2000) Radiobiology for the Radiologiste, 5th, Lippincott Williams & Wilkins, ed. Hardcover 52
- Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ (2002) Reaction of protein chloramines with DNA and nucleosides: evidence for the formation of radicals, protein-DNA cross-links and DNA fragmentation. *Biochem J.*, 365, 605-615. 53
- Helminger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997) Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med.*, 3, 177-182. 54
- Hoy CA, Carswell C, Schimke RT (1993) Bromodeoxyuridine/DNA analysis of replication in CHO cells after exposure to UV light. *Mutat. Res.*, 290(2), 217-30. 55
- Hu XB, Li HR, Ding JY, et al. (2004) Mutagenic mechanism of the A-T to G-C transition induced by 5-bromouracil: An ab initio study, *Biochemistry*, 43, 6361-6369 56
- Hudson EK, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Croteau DL, Anson RM, Bohr VA and Hansford RG (1998) Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Radic. Res.*, 573-579. 57

- Huttermann J (1991) DNA-radicals as structural monitors of direct radiation action: sensitization by incorporation of 5-halouracils. *Radiat Environ Biophys.*, 30(2), 71-79. 58
- Inanami O, Kuwabara M, Hayashi M, Yoshii G, Syuto B, Sato F. (1986) Reaction of the hydrated electron with histone H1 and related compounds studied by e.s.r. and spin-trapping. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.*, 49, 47-56. 59
- Ito T, Rokita SE. (2003) Excess electron transfer from an internally conjugated aromatic amine to 5-bromo-2'-deoxyuridine in DNA. *J Am Chem Soc.*, 125, 11480-11481. 60
- Jain RK (2005), Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307, 58-62. 61
- Johnson T. B. and Matsuo I (1919) Researches on pyrimidines. LXXXVII. Alkylation of 5-amino-uracil *J. Am. Chem. Soc.*, 782-789. 62
- Kadlcik V., Sicard-Roselli C., Mattioli T. A., Kodicek M., Houee-Levin C. (2004) One-electron oxidation of beta-amyloid peptide: sequence modulation of reactivity. *Free Radic Biol Med.*, 37, 881-91. 63
- Karnas SJ, Yu E, McGarry RC, Battista JJ (1999) Optimal photon energies for IUdR K-edge radiosensitization with filtered x-ray and radioisotope sources. *Phys Med Biol.*, 44(10), 2537-2549. 64
- Kinsella TJ, Mitchell JB, Russo A, Morstyn G, Glatstein E (1984) The use of halogenated thymidine analogs as clinical radiosensitizers: rationale, current status, and future prospects: non-hypoxic cell sensitizers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 10(8), 1399-1406 65
- Kinsella TJ, Schupp JE, Davis TW, Berry SE, Hwang HS, Warren K, Balis F, Barnett J, Sands H (2000) Preclinical study of the systemic toxicity and pharmacokinetics of 5-iodo-2-deoxypyrimidinone-2'-deoxyribose as a radiosensitizing prodrug in two, non-rodent animal species: implications for phase I study design. *Clin Cancer Res.*, 6(9):3670-9. 66
- Kit S, Dubbs DR, Frearson PM. (1966) HeLa cells resistant to bromodeoxyuridine and deficient in thymidine kinase activity. *Int J Cancer.*, 1, 19-30. 67
- Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM (1985) The contributions of UVA and UVB to connective tissue damage in hairless mice. *J Invest Dermatol.*, 84(4):272-6. 68

- Klyachko DV, Huels MA, Sanche L. (1999) Halogen anion formation in 5-halouracil films: X rays compared to subionization electrons. *Radiat Res.*, 151, 177-87 69
- Knol JA, Walker SC, Robertson JM, Yang Z, DeRemer S, Stetson PL, Ensminger WD, Lawrence TS (1995) Incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine into colorectal liver metastases and liver in patients receiving a 7-day hepatic arterial infusion. *Cancer Res.*, 55(17), 3687-3691. 70
- Kraus WL, Wong J (2002) Nuclear receptor-dependent transcription with chromatin Is it all about enzymes? *Eur. J. Biochem.* 269, 2275-2283 71
- Larsson P, Andersson E, Johansson U, Ollinger K, Rosdahl I (2005) Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. *Exp Dermatol.*, 14(2), 117-123. 72
- Lati J, Meyerstein D (1978) Oxidation of first-row bivalent transition-metal complexes containing ethylenediaminetetraacetate and nitrilotriacetate ligands by free radicals. A pulse-radiolysis study. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.: Inorg. Chem.* 9, 1105-1118 73
- Lawrence TS, Davis MA, Maybaum J, et al (1990) The dependence of halogenated pyrimidine incorporation and radiosensitization on the duration of drug exposure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 18, 1393-1398. 74
- Levin VA, Prados MR, Wara WM, Davis RL, Gutin PH, Phillips TL, Lamborn K, Wilson CB (1995) Radiation therapy and bromodeoxyuridine chemotherapy followed by procarbazine, lomustine, and vincristine for the treatment of anaplastic gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 32(1), 75-83. 75
- Levesque PL, Michaud M, Cho W, Sanche L (2005) Absolute electronic excitation cross sections for low-energy electron (5 - 12 eV) scattering from condensed thymine. *J Chem Phys.*, 122, 694-701. 76
- Li Y, Owusu A, Lehnert S (2004) Treatment of intracranial rat glioma model with implant of radiosensitizer and biomodulator drug combined with external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 58(2), 519-27 77
- Li X, Sanche L, Sevilla MD (2002) Dehalogenation of 5-Halouracils after Low Energy Electron Attachment: A Density Functional Theory Investigation. *J Phys Chem. A.*, 106, 11248-11253 78

- Li XF, Sevilla MD, Sanche L (2003) DFT investigation of dehalogenation of adenine-halouracil base pairs upon low-energy electron attachment, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (29), 8916-8920. 79
- Limoli CL, Ward JF (1993) A new method for introducing double-strand breaks into cellular DNA. *Radiat Res.* 134(2),160-169. 80
- Lindahl T, Nyberg B (1974) heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 13(16), 3405-3410. 81
- Lindahl T, Nyberg B (1972) rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*.,11(19), 3610-3608. 82
- Ling L. L., Ward J. F. (1990) Radiosensitization of Chinese hamster V79 cells by bromodeoxyuridine substitution of thymidine: enhancement of radiation-induced toxicity and DNA strand break production by monofilar and bifilar substitution. *Radiat Res.*, 121, 76-83. 83
- Lobachevsky PN, Martin RF (2000) Iodine-125 decay in a synthetic oligodeoxynucleotide. I. Fragment size distribution and evaluation of breakage probability *Radiat Res.*, 153(3):263-270. 84
- Matsutani M, Kohno T, Nagashima T, Nagayama I, Matsuda T, Hoshino T, Sano K (1988) Clinical trial of intravenous infusion of bromodeoxyuridine (BUdR) for radiosensitization of malignant brain tumors. *Radiat Med.*, 6(1):33-39. 85
- McLaughlin PW, Lawrence TS, Seabury H, Nguyen N, Stetson PL, Greenberg HS, Mancini WR (1994) Bromodeoxyuridine-mediated radiosensitization in human glioma: the effect of concentration, duration, and fluoropyrimidine modulation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 30(3):601-607. 86
- Medini E, Rao Y, Kim T, Jones TK Jr, Levitt SH (1980) Radiation therapy for advanced head and neck squamous-cell carcinoma using twice-a-day fractionation. *Radiology*, 134(2):531-2. 87
- Menke H, Kohnlein W, Joksche S, Halpern A (1991) Strand breaks in plasmid DNA, natural and brominated, by low-energy X-rays. *Int J Radiat Biol.*, 59(1), 85-96. 88
- Nejedly K, Kittner R, Pospisilova S, Kypr J. (2001) Crosslinking of the complementary strands of DNA by UV light: dependence on the oligonucleotide composition of the UV irradiated DNA. *Biochim Biophys Acta.*, 1517, 365-75. 89
- Nese C, Yuan Z, Schuchmann MN, von Sonntag C (1992) Electron transfer from nucleobase electron adducts to 5-bromouracil. Is guanine an ultimate sink for the 90



- electron in irradiated DNA? *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 527-41.
- Neto JB, Gentil A, Cabral RE, Sarasin A (1992) Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J Biol Chem.*, 267(27):19718-23. 91
- Newton GL, Ly A, Tran NQ, Ward JF, Milligan JR (2004) Radioprotection of plasmid DNA by oligolysines. *Int J Radiat Biol.* 80, 643-51. 92
- Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR (2001) Spiroiminodihydantoin Is the Major Product of the 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine Reaction with Peroxynitrite in the Presence of Thiols and Guanosine Photooxidation by Methylene Blue *Org. Lett.*, 3, 963-966. 93
- Okada A, Yokojima S, Kurita N, Sengoku Y, Tanaka S (2003) Charge transfer in duplex DNA containing mismatch, *J. Mol. Str. Theochem.*, 630, 283-290. 94
- Oleinick NL, Balasubramaniam U, Xue L, Chiu S (1994) Nuclear structure and the microdistribution of radiation damage in DNA. *Int J Radiat Biol.*, 66, 523-9. 95
- Peak JG, Peak MJ (1995) Induction of slowly developing alkali-labile sites in human P3 cell DNA by UVA and blue- and green-light photons: action spectrum. *Photochem Photobiol.*, 61(5):484-7. 96
- Perez AP, Luther WB Halperin EC, Schmidt-Ullrich RK (2004) Principles and Practice of Radiation Oncology, Fourth Edition, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 163-179 97
- Phillips TL, Scott CB, Leibel SA, Rotman M, Weigensberg IJ (1995) Results of a randomized comparison of radiotherapy and bromodeoxyuridine with radiotherapy alone for brain metastases: report of RTOG trial 89-05. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 33(2):339-48. 98
- Pouget JP, Douki T, Richard MJ, Cadet J (2000) DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. *Chem Res Toxicol.*, 13(7):541-9. 99
- Pignol JP, Rakovitch E, Beachey D, Le Sech C (2003) Clinical significance of atomic inner shell ionization (ISI) and Auger cascade for radiosensitization using IUdR, BUdR, platinum salts, or gadolinium porphyrin compounds. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 55(4):1082-91. 100
- Prados MD, Scott C, Sandler H, Buckner JC, Phillips T, Schultz C, Urtasun R, Davis R, Gutin P, Cascino TL, Greenberg HS, Curran WJ Jr (1999) A phase 3 101

- randomized study of radiotherapy plus procarbazine, CCNU, and vincristine (PCV) with or without BUdR for the treatment of anaplastic astrocytoma: a preliminary report of RTOG 9404. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 45(5):1109-15
- Prados MD, Seiferheld W, Sandler HM, Buckner JC, Phillips T, Schultz C, Urtasun R, Davis R, Gutin P, Cascino TL, Greenberg HS, Curran WJ Jr (2004) Phase III randomized study of radiotherapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine with or without BUdR for treatment of anaplastic astrocytoma: final report of RTOG 9404. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 58(4):1147-52. 102
- Pryor WA (1988) Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: It has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 4, 219-223. 103
- Ravanat JL, Douki T, Cadet J (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B.*, 63(1-3), 88-102. 104
- Reuschl H. (1966) Kinetische Untersuchungen zur Gamma-Radiolyse von 5-Bromouracil in wässriger Lösung, *Z. Naturforschg.*, 21, 643-646. 105
- Rew DA, Wilson GD (2000) Cell production rates in human tissues and tumours and their significance. Part 1: an introduction to the techniques of measurement and their limitations. *Eur J Surg Oncol.*, 26(3):227-38. 106
- Rivera E, Schuler RH (1983) Intermediates in the reduction of 5-halouracils by  $\text{eaq}^-$ . *J. Phys. Chem.* 87, 3966-3971 107
- Robertson JM, Ensminger WD, Walker S, Lawrence TS (1997). A phase I trial of intravenous bromodeoxyuridine and radiation therapy for pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 37(2):331-5. 108
- Rochette PJ, Therrien JP, Drouin R, Perdiz D, Bastien N, Drobetsky EA, Sage E (2003) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res.*, 31(11):2786-94. 109
- Phuphanich S, Levin EM, Levin VA (1984) Phase I study of intravenous bromodeoxyuridine used concomitantly with radiation therapy in patients with primary malignant brain tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1769-1772 110
- Sanche L (2002) Nanoscopic aspects of radiobiological damage: Fragmentation induced by secondary low-energy electrons. *Mass Spectrom. Rev.*, 21, 349-69. 111

- Sato K, Taguchi H, Maeda T, Minami H, Asada Y, Watanabe Y, Yoshikawa K (1995) The primary cytotoxicity in ultraviolet-a-irradiated riboflavin solution is derived from hydrogen peroxide. *J. Invest. Dermatol.*, 105(4):608-12 112
- Ito S, Saito I, Matsuura T (1980) Acetone-sensitized photocoupling of 5-bromouridine to tryptophan derivatives via electron-transfer process, *J. Am. Chem. Soc.*, 102(25); 7535-7541. 113
- Scholes G, Willson RL, Ebert M (1969) Pulse radiolysis of aqueous solutions of deoxyribonucleotides and of DNA: Reaction with hydroxy-radicals. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 17-18. 114
- Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD (1993) Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90(14):6666-70. 115
- Sheldon PW, Fowler JF (1979) The effect of recovery from potentially lethal damage on the determination of reoxygenation in a murine tumour, *Br J Radiol.*, 52(620):634-41 116
- Singer B, Kroger M, Carrano M (1978) O2- and O4-alkyl pyrimidine nucleosides: stability of the glycosyl bond and of the alkyl group as a function of pH. *Biochemistry*, 17(7):1246-50. 117
- Somers C. E, Humphrey R. M. (1963) A chromosome study of radiation sensitization by 5-bromodeoxyuridine. *Exp Cell Res.*, 30, 208-17. 118
- Speth PA, Kinsella TJ, Chang AE, Klecker RW, Belanger K, Collins JM (1988) Selective incorporation of iododeoxyuridine into DNA of hepatic metastases versus normal human liver. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 44(4):369-75. 119
- Srinivasan VT, Van de Vorst A. (1971) Formation of free radicals in aliphatic and aromatic amino acids by trapped electrons: an E.S.R. study. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 133-42. 120
- Sterner DE, Berger S L (2000) Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors, *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 64, 435-459 121
- Sugiyama H., Tsutsumi Y., Saito I. (1990) Highly sequence-selective photoreaction of 5-bromouracil-containing deoxyhexanucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*; 112, 6720-6721. 122
- Szybalski W (1974) X-ray sensitization by halopyrimidines, *Cancer Chemother Rep.*, 58, 539-57. 123

- Goffman TE, Dachowski LJ, Bobo H et al. (1992) Long-term follow-up on National Cancer Institute Phase I/II study of glioblastoma multiforme treated with iododeoxyuridine and hyperfractionated irradiation. *J. Clin. Oncol.*, 264-268. 124
- Usami N, Kobayashi K, Maezawa H, Hieda K, Ishizaka S (1991) Biological effects of Auger processes of bromine on yeast cells induced by monochromatic synchrotron X-rays. *Int J Radiat Biol.*, 60(5):757-68. 125
- Van Bree C, Franken NA, Bakker PJ, Klomp-Tukker LJ, Barendsen GW, Kipp JB. (1997) Hyperthermia and incorporation of halogenated pyrimidines: radiosensitization in cultured rodent and human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 39, 489-96 126
- Van der Leun JC.(1984) UV-carcinogenesis, *Photochem Photobiol.*, 39(6):861-8. 127
- Voityuk A. A., Michel-Beyerle M. E., Roosch N., (2001) Energetics of excess electron transfer in DNA, *Chem. Phys. Let.*, 342 (1-2), 231-238 128
- Von Sonntag C. (1987) The chemical basis of radiation biology, Ed. Taylor and Francis, London - New York - Philadelphia. 129
- Wagenknecht H. A., Stemp E. D., Barton J. K. (2000) DNA-Bound peptide radicals generated through DNA-mediated electron transport. *Biochemistry.* 39, 5483-91. 130
- Wamer WG, Wei RR. (1997) In vitro photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation. *Photochem Photobiol.* 65(3):560-3. 131
- Wang Y, Liu Z, Dixon C. (2002) Major adenine products from 2-methyl-1,4-naphthoquinone-sensitized photoirradiation at 365 nm. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(5):1252-7. 132
- Watson GE, Gillies NE. (1970) The oxygen enhancement ratio for x-ray-induced chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.*, 17, 279-83. 133
- Wetmore S. D., Boyd R. J. and Eriksson L. A. (2001) A theoretical study of 5-halouracils: electron affinities, ionization potentials and dissociation of the related anions, *Chem Phys Let.*, 343, 151-158 134
- Wojcik A. von Sonntag C. Obe G. (2003) Application of the biotin-dUTP chromosome labelling technique to study the role of 5-bromo-2'-deoxyuridine in the formation of UV-induced sister chromatid exchanges in CHO cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B - Biology.* 69(2):139-44 135

- |  |     |
|--|-----|
| Xue LY, Friedman LR, Oleinick NL, Chiu SM (1994) Induction of DNA damage in gamma-irradiated nuclei stripped of nuclear protein classes: differential modulation of double-strand break and DNA-protein crosslink formation <i>Int J Radiat Biol.</i> , 66, 11-21.                 | 136 |
| Yang JL, Fernandes DJ, Wheeler KT, Capizzi RL (1996) PALA enhancement of bromodeoxyuridine incorporation into DNA increases radiation cytotoxicity to human ovarian adenocarcinoma cells. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> , 34(5):1073-9                                      | 137 |
| Zheng Y, Cloutier P, Hunting D J, Wagner J R, Sanche L ( 2004) Glycosidic Bond Cleavage of Thymidine by Low-Energy Electrons <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 126(4); 1002-1003.   | 138 |
| Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails, <i>Genes Dev.</i> , 15, 2343-2360  | 139 |
| Zimbrick JD, Ward JF, Myers LS Jr., (1969) Studies on the chemical basis of cellular radiosensitization by 5-bromouracil substitution in DNA. I. Pulse- and steady-state radiolysis of 5-bromouracil and thymine. <i>Int. J. Rad. Biol. Rel. Stud. Phys. Chem. Med.</i> 16, 525-34 | 140 |
| Zimbrick JD, Ward JF, Myers LS Jr. (1969) Studies on the chemical basis of cellular radiosensitization by 5-bromouracil substitution in DNA. I. Pulse- and steady-state radiolysis of 5-bromouracil and thymine., <i>Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.</i> ,16, 505-23   | 141 |

**Remerciements :**

J'aimerai remercier très sincèrement mes trois codirecteurs Léon Sanche, Mickael A. Huels et particulièrement Darel Hunting pour ses nombreux encouragements et les grandes discussions scientifiques ou non.

À toi, Julie, pour avoir été aussi patiente et compréhensive, pour ton soutien et surtout tout ton amour, je te remercie du plus profond de mon cœur.

A mes deux filles, Anouk et Alixe, je vous remercie d'Être là et d'illuminer ma vie.

Papa et maman, je vous remercie énormément pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Votre amour sera à jamais graver dans mon cœur.

*Papa e mama, grazie mille per tutto il vostro amore, vi amo!*

Valérie, Marie-France, mes deux merveilleuses sœurs, j'aimerai vous remercier pour vos soutiens et vos encouragements. Mais appelez-moi docteur maintenant!

J'aimerai remercier Sonia pour son soutien et sa précieuse aide au tout au long de ma thèse.

Merci Carole, pour ton aide et tes nombreux conseils sur l'allaitement et l'éducation des enfants; j'espère un jour être aussi ordonné que toi mais pas aussi matante!

Un grand MERCI au Docteur Jean-Philippe Pignol, au professeur Guylain Boissoneault et au professeur Richard Wagner d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Merci aux ami(e)s et collègues encore présents, Marjorie, Lamia, Marie-Éve, Sébastien, François, Johanne, Daniel; et à ceux qui sont déjà partis, Badia, Pascale, Isabelle, Pierre, Frédéric, Dominique, Bertrand, Yan ...

Merci à tous les étudiant(e)s pour leurs aides et leurs bonnes humeurs qui font de ce département un bel endroit pour étudier.

À mon ami Paul, je te remercie et espère avoir encore l'occasion de te revoir...